

**Untersuchungen über gebundene IES
in Karyopsen von Saathafer
(*Avena sativa* L.)**

Christine Siegert-Benz

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551913_0022

Untersuchungen über gebundene IES
in Karyopsen von Saathafer (Avena sativa L.)

Dissertation
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt
von
Christine Siegert-Benz
aus
Amberg

April 1980



1. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 1980

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. Einleitung

1

II. Material und Methoden

1. Geräte	5
2. Pufferlösungen	6
3. Pflanzenmaterial	7
4. Gewinnung von peroxidfreiem Äther	8
5. Ätherextraktionen	9
6. Dünnschichtchromatographie	10
6.1. DC auf gepufferten Kieselgelplatten GF ₂₅₄	10
6.2. DC auf Kieselgelplatten G	10
6.3. DC auf Aluplatten	11
6.4. Fließmittelsysteme für DC	11
6.5. Sprühreagenzien für DC	12
7. Densitometrie	13
7.1. Ausmessen der IES-Flecke nach DC	13
7.2. Ausmessen der Gelbanden nach Elektrophorese	13
8. Biotest	13
8.1. Gewinnung der IES-Eluatlösungen	14
8.2. Statistische Auswertung des Biotests	15
9. Darstellung von Diazomethan	16
10. Gaschromatographie des IES-Methylesters	17
11. Methoden zur Isolierung verschiedener IES-haltiger Fraktionen aus Haferkaryopsen	18
11.1. Extraktion mit 10 %iger NaCl-Lösung und Auftrennung des IES-haltigen Überstandes	18
11.2. Wasserextraktion mit dem Rückstand des NaCl-Puffer-Ansatzes und anschließende Gelfiltration	20
11.3. Wasserextraktion nach Entfetten der Karyopsen mit n-Butanol und anschließende Ionenaustauscherchromatographie des Rohextraktes	21
12. Auftrennung des Wasserextraktes von entfetteten Haferkaryopsen mit Isolierung einer IES-haltigen Zuckerfraktion nach successiven Gelfiltrationen bei 4° C	23

	Seite
12.1. Säulenchromatographie des Rohextraktes	23
12.2. Säulenchromatographie der ersten P-2 Fraktion	24
12.3. Säulenchromatographie der salzfreien zweiten P-10 Fraktion	26
12.4. Entsalzen der phosphathaltigen Säulenfrak- tionen mittels Gelfiltration	27
13. Untersuchungen zur Charakterisierung der IES-hal- tigen Fraktionen anhand ihrer Inhaltsstoffe	28
13.1. Proteinbestimmungen	28
13.2. Gel-Elektrophoresen	30
13.2.1. Disc-Elektrophorese	30
13.2.2. Isoelektrische Focussierung	33
13.2.3. SDS-Elektrophorese	34
13.3. Aminosäureanalyse	36
13.4. Papierchromatographie der Zucker	36
13.5. Zuckerbestimmung	37
13.6. Kartierung von Zuckerpeptiden nach Trypsin- Abbau	38
13.7. Bindungsversuche mit Concanavalin A	39
13.8. Phosphatbestimmung	40
13.9. Bindungsversuche mit Aktivkohle	40

III. Ergebnisse

1. Nachweis der aus Haferkaryopsen isolierten IES mittels verschiedener Methoden	42
1.1. DC nach saurer Ätherextraktion	42
1.1.1. Bestimmung der IES-Gesamtmenge sowie der Menge an freier und gebundener IES	43
1.1.2. Prüfung des Einflusses von p-Cumarsäure und 3-Indolyl-Brenztraubensäure auf die IES-Bestimmung	44
1.2. Biotest nach Reinigung über DC	46
1.2.1. Nachweis der Bioaktivität nach DC mit authentischer IES	46
1.2.2. Nachweis der Bioaktivität der IES- Gesamtmenge sowie der freien IES aus Haferkaryopsen	48

1.2.3. Nachweis der Bioaktivität eines "Wachstumshemmstoffes" im IES-Eluat nach DC	50
1.2.3.1. Vorextraktion des Eluates der IES-Gesamtmenge mit Äther bei pH = 7,0	51
1.2.3.2. Erhöhung der IES-Konzentration im Eluat der freien IES wie der IES-Gesamtmenge durch Zusatz von authentischer IES	52
1.3. Gaschromatographie des IES-Methylesters	56
1.3.1. Methylierung von authentischer IES und Nachweis des Esters im GC	57
1.3.2. Methylierung der IES des ersten P-2 Peaks und Nachweis des Esters sowohl über GC als auch DC	57
1.3.3. Nachweis des IES-Esters im GC nach DC	59
1.3.3.1. GC mit authentischem IES-Methylester nach DC	60
1.3.3.2. Prüfung der Effektivität der Reinigung des IES-Esters aus dem ersten P-2 Peak über DC anhand des GC	61
1.4. Vergleich der verschiedenen getesteten Methoden	62
2. Untersuchungen zur Extraktion verschiedener IES-haltiger Fraktionen aus Haferkaryopsen und deren quantitative IES-Bestimmung	63
2.1. Extraktion mit 10 %iger NaCl-Lösung	64
2.1.1. Auftrennung des salzlöslichen IES-haltigen Extraktes und Untersuchungen zur Stabilisierung der IES	66
2.1.1.1. Trennung durch Ammonsulfat-Fällung und Entsalzen der IES-haltigen Proteinfraction	67
2.1.1.2. Extraktion und Trennung mit Zusatz von Ascorbinsäure und PMSF	69

2.1.2. Auftrennung des Rückstandes nach NaCl-Extraktion	73
2.1.2.1. Wasserextraktion	73
2.1.2.2. Untersuchungen zur Stabilisierung der IES durch Zusatz von Ascorbinsäure und Hydrochinon	75
2.1.2.3. Charakterisierung des Extraktes vor und nach Gelfiltration	76
2.2. Wasserextraktion der Karyopsen nach Entfetten mit n-Butanol	80
2.2.1. Gewinnung des Rohextraktes	81
2.2.1.1. Wasserextraktion nach Vorbehandlung der Karyopsen	81
2.2.1.2. Wasserextraktion ohne Vorbehandlung der Karyopsen	82
2.2.2. Teilweise Charakterisierung des IES-haltigen Extraktes vor und nach Gelfiltration	83
2.3. Vergleich der beiden Wasserextrakte	88
2.3.1. Vergleich vor Gelfiltration	89
2.3.2. Vergleich nach Gelfiltration und Entsalzung der IES-haltigen Peakfraktion	89
3. Auftrennung des wasserlöslichen IES-haltigen Rohextraktes aus Haferkaryopsen mit Untersuchungen der einzelnen Fraktionen zur Identifizierung ihrer Inhaltsstoffe	93
3.1. Reinigung der gebundenen IES des Wasserextraktes	93
3.1.1. Entsalzen der phosphathaltigen IES-Säulenfraktion nach Gelfiltration des Rohextraktes über Ultrogel AcA 54	93
3.1.2. Auftrennung der Extrakte vor und nach Gelfiltration mittels DC	95
3.1.2.1. Chromatographie des Rohextraktes	95
3.1.2.2. Chromatographie der Biogel P-2 Säulenfraktionen	98
3.1.3. Präparative Säulenelektrophorese der ersten P-2 Fraktion mit GC-Untersuchungen der eluierten Banden	101

	Seite
3.1.4. Bindungsversuche der ersten P-2 Fraktion an Concanavalin A-Sepharose	103
3.1.5. Gelfiltration der ersten P-2 Fraktion über Biogel P-10	104
3.1.6. Entsalzen der IES-haltigen Biogel P-10 Säulenfraktion über Biogel P-2	104
3.1.6.1. IES-Bestimmung der Biogel P-2 Peakfraktionen	105
3.1.6.2. DC der salzfreien zweiten P-10 Fraktion	106
3.1.7. Gelfiltration der ersten P-2 Fraktion über Biogel P-2 und P-4 im Vergleich zu Biogel P-10	109
3.1.8. Fällungen IES-haltiger Fraktionen mit dem Lectin Concanavalin A	110
3.1.8.1. Con A-Fällung mit der ersten P-2 Fraktion	111
3.1.8.2. IES-Bestimmung nach Con A-Fällung der salzfreien zweiten P-10 Fraktion	112
3.1.8.3. Auftrennung des Überstandes der ersten P-2 Fraktion nach Con A-Fällung über Biogel P-10	113
3.1.9. Con A-Fällung unter Zusatz von Hydrochinon und Auftrennung der salzfreien zweiten P-10 Fraktion über Biogel P-4	114
3.1.10. Con A-Fällung ohne Hydrochinon und Auftrennung der salzfreien zweiten P-10 Fraktion	114
3.1.10.1. DC der salzfreien zweiten P-10 Fraktion	115
3.1.10.2. IES-Bestimmung nach Entsalzung der zweiten P-10 Fraktion	117
3.1.10.3. Gelfiltration der salzfreien zweiten P-10 Fraktion über Biogel P-2 und P-4	118
3.1.11. Optimierter Reinigungsgang der IES-Bindung III des Wasserextraktes	120

	Seite
3.2. Charakterisierung IES-haltiger Fraktionen	120
3.2.1. Molekulargewichtsbestimmung der ersten P-2 Fraktion	122
3.2.1.1. Gelfiltration über Sephadex G-50	122
3.2.1.2. SDS-Elektrophorese	123
3.2.1.3. Vergleich der Ergebnisse	125
3.2.2. Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung des 1. Peaks der Biogel P-2 Säule	126
3.2.2.1. Proteinbestimmungen	127
3.2.2.2. Gewichtsmäßige Summenbilanz	128
3.2.2.3. Kartierung von zuckerhaltigen Peptiden nach Trypsin-Abbau	130
3.2.3. Glykoproteinanfärbung nach Disc-Elektrophorese der ersten P-2 Fraktion	131
3.2.4. Vergleichende Untersuchungen des entsalzten ersten und zweiten P-10 Peaks	132
3.2.5. MG-Bestimmung der IES-Verbindung III mittels verschiedener Gelchromatographien	134
3.2.5.1. Gelfiltration über Biogel P-10 der ersten P-2 Fraktion	134
3.2.5.2. Gelfiltration über Biogel P-4 der salzfreien zweiten P-10 Fraktion nach Con A-Fällung unter Zusatz von Hydrochinon	136
3.2.5.3. Gelfiltration über Biogel P-4 der salzfreien zweiten P-10 Fraktion nach Con A-Fällung ohne Hydrochinon	137
3.2.6. Adsorptionschromatographie der IES-Verbindung III an einer Kohle-Celite-Säule	139
3.2.7. Charakterisierung der IES-Verbindung III mittels UV-Absorption	141

3.2.8. Zusammenfassung der Eigenschaften der IES- Verbindung III und ihres Verhaltens bei verschiedenen Untersuchungen	143
--	-----

<u>IV. Diskussion</u>	145
-----------------------	-----

<u>V. Zusammenfassung</u>	161
---------------------------	-----

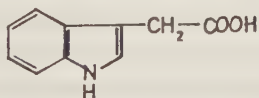
<u>VI. Literaturverzeichnis</u>	163
---------------------------------	-----

Abkürzungen und Definitionen

AS	Aminosäure
BPB	Bromphenolblau
Con A	Concanavalin A
DC	Dünnschichtchromatographie
DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Äthylendiaminoessigsäure, Na_4 - und Na_2 -Salz
GC	Gaschromatographie
HSA	Huhnserumalbumin
IEP	Isoelektrischer Punkt
IES	Indolyl-3-essigsäure
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
PC	Papierchromatographie
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyläthylendiamin
TPCK	L(1-Tosylamido-2-phenyl)äthyl-chloromethyl-Keton
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
Haferkaryopse	unbespelzte Grasfrucht
Haferkorn	bespelzte Karyopse

I. E I N L E I T U N G

Das Phytohormon Indolyl-3-essigsäure (IES) bewirkt in Pflanzen neben zahlreichen anderen morphogenetischen Effekten (z.B. Zellteilungen, Wurzelbildung, apikale Dominanz, Blatt- und Frucht-fall, Parthenokarpie und Enzymaktivitätsänderung) hauptsächlich als Streckungswuchsstoff einen irreversiblen Längenzuwachs der Zellen. In höheren Pflanzen kommt es in verschiedenen Formen vor, die als freies und gebundenes Auxin bezeichnet werden. Nach KOTAKA et al. (1965) versteht man unter freiem Auxin die nach Ansäuern des Pflanzenextraktes mit Äther extrahierbare IES, während sich das gebundene Auxin erst nach anschließender Alkalihydrolyse in der wäßrigen Phase freilegen läßt.



IES = Indolyl-3-essigsäure

Die größte Aktivität bezüglich der physiologischen Wirkung zeigt das freie Auxin. Bei den gebundenen Auxinen unterscheidet man in von der Pflanze enzymatisch spaltbare Formen, wie z.B. die Zuckerester (IES-Glucoseester: ZENK, 1961) und nicht spaltbare, wie z.B. die Peptidverbindungen der IES mit Asparagin- und Glutaminsäure (ANDREAE u. YSSELSTEIN, 1960). Mit Ausnahme einiger synthetisierter IES-Aminosäurenkonjugate, deren biologische Aktivität anhand des Koleoptilzylindertestes nachgewiesen wurde (FEUNG et al., 1977) und der IES-Inositol-Ester, die auf Zellteilungen stimulierend einwirken können (NICHOLLS, 1967), zeichnen sich die gebundenen Formen des Auxins durch physiologische Inaktivität aus (BERGER u. AVERY, 1944; WILDMANN u. BONNER, 1948; HEMBERG, 1955).

Zahlreiche Untersuchungen über freies und gebundenes Auxin sind seit dem exakten Nachweis dieses Pflanzen-Hormons (WENT, 1928) an verschiedenen Pflanzen durchgeführt worden. Zunächst interessierte dabei das quantitative Mengenverhältnis der freien zur ge-

bundenen IES, während später gleichzeitig versucht wurde, sowohl die Art der Bindung als auch die Struktur selbst der verschiedenen IES-Verbindungen aufzuklären. Dazu wurden in Keimlingen neben den endogen vorliegenden, natürlichen IES-Verbindungen auch die Metabolite von exogen zugesetzter authentischer IES untersucht (ANDREAE u. GOOD, 1955; ZENK, 1961; DAVIES, 1972; VENIS, 1972).

In Getreidekörnern liegt die gebundene IES hauptsächlich als IES-Ester vor (BANDURSKI u. SCHULZE, 1977), wie der Vergleich der Bestimmungen sowohl von ester- als auch peptidgebundener IES mit verschiedenen Samenkörnern ergab. Obwohl als klassisches Untersuchungsobjekt zunächst Hafer diente, wurden mit Maiskörnern in der Folgezeit bei weitem mehr Versuche durchgeführt, da diese einen wesentlich höheren Gehalt an IES aufweisen (BANDURSKI u. SCHULZE, 1977), so daß bis heute die am besten untersuchten, natürlich vorkommenden IES-Verbindungen aus Maiskörnern isoliert worden sind.

So gelang es der Arbeitsgruppe um BANDURSKI nach und nach neun niedermolekulare, wasserlösliche IES-Ester aus Mais zu charakterisieren und zu identifizieren. Als gebundene IES wurden verschiedene, isomere Ester der IES mit Myo-inositol und mit Myo-inositolglycosiden nachgewiesen (UEDA u. BANDURSKI, 1969). Die Isolierung verschiedener IES-Glucose-Ester (EHMANN, 1974), ebenso wie Ester, die 2 oder 3 Mol IES pro Mol Myo-inositol aufweisen, wurde ebenfalls beschrieben (EHMANN u. BANDURSKI, 1974). Zusätzlich zu diesen Estern ließ sich in Mais noch ein - allerdings wasserunlöslicher - hochmolekularer Cellulose-IES-Ester charakterisieren (PISKORNIK u. BANDURSKI, 1972).

Ebenfalls ein IES-Zuckerester konnte in Reiskörnern gefunden werden, wobei 10 % der IES-Esterfraktion aus dieser IES-Myo-inositol-Verbindung bestehen (HALL u. BANDURSKI, 1979).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Mais, wo nur IES-Zuckerester in den Samenkörnern gefunden wurden, konnten aus Weizenkörnern IES-haltige Proteinverbindungen angereichert werden (GORDON, 1946).

In Haferkörnern, die außer freier nur estergebundene IES enthalten (BANDURSKI u. SCHULZE, 1977), konnte bislang nur IES gefunden werden, die kovalent an Protein oder Glykoprotein gebunden vorliegt, wie sowohl von ZIMMERMANN (1978) als auch von PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) übereinstimmend aufgrund ihrer Untersuchungen beschrieben wird.

ZIMMERMANN (1978) extrahierte 2 verschiedene IES-Proteinfraktionen aus Haferkörnern, die er aufgrund ihrer Löslichkeit der Gruppe der Albumine und der Gluteline zuordnete. Nach der von KÜHNAU u. GANSSMANN (1976) angegebenen Verteilung der Haferproteine auf die verschiedenen Gewebe des Korns folgerte er daraus, daß vermutlich die an Glutelin gebundene IES im Endosperm und die an Albumin gebundene IES im Embryo zu finden ist. Da estergebundene IES relativ instabil ist, war es PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) nicht möglich, eine IES-Verbindung aus Hafer zu isolieren und zu identifizieren. Deshalb wurde von ihnen nur eine angereicherte IES-haltige Glykoproteinfraktion (MG: 5000-20000 Daltons) untersucht und charakterisiert. Aufgrund ihrer Ergebnisse liegen 80 % der mittels 50 %igem Aceton aus Haferkörnern extrahierbaren IES mit Polymeren verestert vor, die mit Ammonsulfat, Äthanol oder Aceton fällbar sind. Diese Polymere zeigen aber unterschiedliches Dissoziationsverhalten, da 2/3 an Kationenaustauscher bei pH = 3 binden, während 1/3 bei diesen Bedingungen nicht gebunden werden. Die von PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) näher untersuchte IES-haltige Glykoproteinfraktion entspricht der Fraktion, die bei pH = 3 eine positive Nettoladung aufweist.

Während also in Mais insgesamt 4 verschiedene Gruppen von IES-Estern (IES-Myo-inositle, IES-Myo-inositol-glycoside, IES-Glucose und IES-Cellulose) identifiziert und charakterisiert wurden, konnten bei Haferkörnern bislang nur Hinweise auf 2 verschiedene IES-Fraktionen bzw. Verbindungen erhalten werden, die zumal durch unterschiedliche Extraktionsmethoden gewonnen und nur teilweise charakterisiert werden konnten (PERCIVAL u. BANDURSKI, 1976; ZIMMERMANN, 1978). Es schien daher zwangsläufig von Interesse, auch bei Hafer einen vollständigeren und genaueren Überblick über dessen IES-Verbindungen zu erhalten, als dies bisher möglich gewesen war.

Voraussetzung hierfür war als erstes, ein exaktes und schnell durchzuführendes IES-Bestimmungsverfahren durch Vergleich verschiedener Methoden miteinander zu entwickeln bzw. zu modifizieren. Gleichzeitig sollte sich somit die Genauigkeit der ermittelten Werte sehr gut überprüfen lassen.

Da die bereits von anderen Autoren ebenfalls beobachtete hohe Instabilität der IES-Ester (HAMILTON et al., 1961; BANDURSKI u. SCHULZE, 1974; PERCIVAL u. BANDURSKI, 1976) zu großen IES-Verlusten während Extraktion und Anreicherung IES-haltiger Proteinfraktionen führte, war es zudem erforderlich, ein System zu finden, in dem die gebundene IES vor enzymatischer Zersetzung geschützt wird und so stabil vorliegt.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte dann sein, mit Hilfe eines solchen auf IES-Verbindungen stabilisierend wirkenden Systems einen aus Haferkaryopsen (= entspelzte Haferkörner) gewonnenen Extrakt aufzutrennen, die Zahl der IES-Verbindungen festzustellen und nach Möglichkeit bislang noch nicht identifizierte IES-Verbindungen zu isolieren und zu charakterisieren. Es sollte ferner versucht werden, die im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen IES-haltigen Fraktionen mit den bislang bekannten IES-Verbindungen aus Hafer oder eventuell auch aus Mais zu vergleichen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Geräte

a. Geräte, die bei den Extraktionen verwendet wurden:

Kühlzentrifuge G 50 K (Fa. WKF)

Becherrotor: 6 x 250 ml, 16500 UpM = 40000 x g

8 x 38 ml, 20000 UpM = 40000 x g

Präparative Ultrazentrifuge (UZ, Fa. WKF-Hitachi)

Rotor RP 30: 30000 UpM = 106657 x g

RP 65T: 40000 UpM = 139500 x g

Tischzentrifuge: Typ Junior I (Fa. Christ)

Gefriertrocknung: Anlage L2 (Fa. WKF)

b. Geräte, die bei den Säulenchromatographien Verwendung fanden:

Pumpe: Schlauchpumpe Minipuls 2 (Fa. Abimed)

Optische Einheit: Durchflußphotometer mit Messung der Transmission

1. Servachromatocord bei 254 nm (Fa. Serva)

2. Model 1140 Type 6, Dual Beam UV-visible optical unit bei 280 nm (Fa. Isco)

Schreiber: 1. Minicorder CF (Fa. Serva)

2. Isco-Model UA-5 Absorbance Monitor (Fa. Isco)

Fraktionssammler: Rundtellerfraktionssammler (Fa. Gilson)

c. Spektralphotometer, die zur Extinktionsmessung und zur Aufnahme von UV-Spektren dienten:

DMR 22: 2 Strahl-Spektralphotometer mit Doppelmonochromator (Fa. Zeiss)

1800 SP UV-Spektralphotometer: optische Einheit Uvicord II (Fa. LKB) mit angeschlossenem Unicam AR-25 Linear-schreiber

Alle weiteren speziellen Geräte werden jeweils bei den damit durchgeführten Untersuchungen beschrieben.

2. Pufferlösungen

a. für DC-Platten:

0,033 M Kaliumphosphatpuffer pH = 5,2:

Lösung 1: 454 mg KH_2PO_4 in 100 ml Aqua dest.

Lösung 2: 581 mg K_2HPO_4 in 100 ml Aqua dest.

Lösung 1 mit Lösung 2 auf pH = 5,2 einstellen.

b. für Extraktionen:

1 M Kaliumphosphatpuffer pH = 7,8:

Lösung 1: 174,2 g K_2HPO_4 auf 1 Liter Aqua dest.

Lösung 2: 48,9 g KH_2PO_4 auf 360 ml Aqua dest.

Lösung 1 mit Lösung 2 auf pH = 7,8 einstellen.

10 % NaCl-Puffer/Ascorbinsäure + PMSF pH = 7,0:

10^{-1} M Imidazol : 6,8 g

10^{-2} M Natriumascorbat : 1,98 g

10^{-5} M PMSF : 0,1 ml (174 mg PMSF auf 10 ml Äthanol)

10 % NaCl : 100 g

Alle Substanzen in Aqua dest. lösen, mit HCl konz. pH = 7,0 einstellen und auf 1 Liter auffüllen.

10 % gepufferte NaCl-Lösung pH = 7,0:

Lösung 1: 0,599 g NaH_2PO_4 in 500 ml Aqua dest.

Lösung 2: 1,340 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ in 500 ml Aqua dest.

Lösung 2 mit Lösung 1 auf pH = 7,2 einstellen. In ca. 780 ml des 10^{-2} M Na-Phosphatpuffers pH = 7,2 werden 80 g NaCl gelöst, mit 10 N NaOH pH = 7,0 eingestellt und mit Puffer auf 800 ml aufgefüllt.

c. für Säulenchromatographien:

10^{-3} M Kaliumphosphatpuffer pH = 7,0:

Lösung 1: 348,4mg K_2HPO_4 in 2 Liter Aqua dest.

Lösung 2: 408,3mg KH_2PO_4 in 3 Liter Aqua dest.

Lösung 2 mit Lösung 1 auf pH = 7,0 einstellen.

10⁻² M Natriumphosphatpuffer/10⁻⁴ M Hydrochinon pH = 7,0:

Lösung 1: 10,74 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O in 3 Liter Aqua dest.

Lösung 2: 4,8 g NaH₂PO₄ in 4 Liter Aqua dest.

Lösung 1 mit Lösung 2 auf pH = 7,0 einstellen, dann 11 mg Hydrochinon pro Liter Puffer lösen.

3. Pflanzenmaterial

a. zur Gewinnung des Hafermehls:

Über den ganzen Zeitraum der Arbeit wurde ungebeizter Saathafer (*Avena sativa* L.) der Sorte "Husar" (Ernte 1974, Baywa Zentrallager Feldkirchen) verwendet. Die Haferkörner (= bespelzte Karyopsen) mußten für jede Aufarbeitung frisch per Hand entspelzt werden. Durch Auswiegen der Karyopsen und der dazugehörigen Spelzen von 100 g Körnern konnte das Gewicht der Karyopsen (ohne Spelzen) mit 75 g und das der Spelzen mit 25 g bestimmt werden. Da das Verhältnis von 3:1 der Karyopsen zu den Spelzen bei wiederholten Wägungen mit unterschiedlichen Mengen immer konstant blieb, kann vom Gewicht der Karyopsen auf das Körnergewicht (einschl. Spelzen) umgerechnet werden. Die entspelzten Haferkörner (= Karyopsen) ließen sich dann vor jeder weiteren Verarbeitung zunächst einmal in einer Kaffeemühle per Hand zu Mehl verarbeiten.

b. für den Biotest:

Da sich Weizenkoleoptilen durch schnelleres Wachstum, eine größere Stabilität und Festigkeit gegenüber Haferkoleoptilen auszeichnen, wurde für den Biotest (Zylindertest) ungebeiztes Weizensaatgut (*Triticum aestivum*), das im Brutschrank bei 25°C zum Keimen gebracht wurde, verwendet. Bei der Ernte nach 3 Tagen mußte darauf geachtet werden, nur gerade gewachsene und völlig intakte Koleoptilen auszuwählen, da gekrümmte Koleoptilen nach dem Biotest nur ungenau ausgemessen werden können. Für den Biotest mußten dann die Koleoptilen von ihren Primärblättern abgezogen und ihre IES-reichen Spitzen (ca. 0,3 mm) mit einer Rasierklinge dekapitiert werden. Nachdem durch Kürzen der Koleoptile am anderen Ende die Gesamtlänge des Zylinders auf 10 mm gebracht worden war, wurden diese Zylinder bis zum Einsatz im Biotest in einer feuchten Kammer

gesammelt und maximal 30 Minuten darin aufbewahrt.

4. Gewinnung von peroxidfreiem Äther

a. mittels Säulenchromatographie:

Der zum Ausschütteln aller IES-haltigen Karyopsenextrakte und Säuleneluate verwendete peroxidfreie Äther wurde über eine Aluminiumoxidsäule gewonnen. Dazu wurde der Rohäther über eine mit basischem Al_2O_3 gefüllte Säule (2/25 cm) gereinigt. Nach Verwerfen des Vorlaufs und gelegentlich während des Säulenlaufs wurde mit Peroxidstäbchen (Fa. Merck) die Reinheit des tropfenweise eluierten Äthers geprüft. Der peroxid- und wasserfreie Äther wurde anschließend kühl und dunkel gelagert.

b. mittels Destillation:

Da sich der über die Säule gereinigte Äther nach Einspritzen ins GC nicht als chromatographisch rein erwies, mußte der zum IES-Ester-Nachweis am GC verwendete Äther nach einer abgewandelten Methode von LARSEN et al. (1955) gereinigt werden.

Hierzu wurde 1 Liter Rohäther 3 mal mit je 0,5 g fein zerstoßenem Calciumoxid, 2,5 g Eisen-II-sulfat und wenig dest. Wasser kräftig geschüttelt. Anschließend wurde der Äther im Wasserbad bei 40°C über eine Kolonne destilliert, wobei die ersten 50 ml und die letzten 100 ml verworfen wurden. Das im Äther enthaltene überdestillierte Wasser wurde im Tiefkühlfach ausgefroren.

Zur Herstellung von "absolutem" Äther, der zur IES-Methylierung nötig war, wurde frisch geschnittenes Natrium (in Drahtform gepreßt) als Trockenmittel verwendet. Der so gewonnene Äther erwies sich im GC als absolut rein.

5. Ätherextraktionen

a. nach Alkali-Hydrolyse:

Bei der alkalischen Hydrolyse zur Bestimmung der gebundenen IES oder Gesamtmenge an IES wurde das gemahlene Pflanzenmaterial sowie die lyophilisierten Extrakte oder Säuleneluate in 1 N NaOH für 24-48 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur stehengelassen. Die darauffolgende saure Ätherextraktion ließ sich nach folgenden Schritten durchführen:

Hydrolisat : 2 mal mit Äther dest. ausschütteln

wäßrige Phase : pH = 2,7 mit 5 %iger H_2SO_4 einstellen, 3 mal mit Äther dest. ausschütteln, Ätherphasen vereinigen

Ätherphase : 3 mal mit 5 %iger $NaHCO_3$ -Lösung ausschütteln

wäßrige Phase : siehe oben

Ätherphase : mit dest. Wasser neutral waschen, über Natriumsulfat trocknen (ca. 3 Std.), Äther bei 25°C einengen, Rückstand in Aceton dest. gelöst chromatographieren

b. nach Methanolextraktion:

Zur Isolierung der freien und gebundenen IES wurde das zerkleinerte Pflanzenmaterial 6 Stunden im Dunkeln entweder mit 250 ml siedendem Methanol in einer Soxhletapparatur extrahiert oder aber, falls nur die freie IES benötigt wurde, bei 80°C in Methanol unter Rühren gekocht. Nach Abfiltration der ausgefallenen Festbestandteile wurde der Methanolextrakt, der die freie IES enthielt, bei 25°C bis auf einen Rest eingeeengt und dieser in 110 ml 5 %iger $NaHCO_3$ -Lösung aufgenommen. Die sich anschließende saure Ätherextraktion erfolgte nach 5.a. Der Rückstand der Methanolextraktion, der die gebundene IES enthielt, wurde nach Alkali-Hydrolyse ebenfalls wie unter 5.a. mit Äther ausgeschüttelt.

6. Dünnschichtchromatographie

6.1. DC auf gepufferten Kieselgelplatten GF₂₅₄

Fettfreie Glasplatten (20/20 cm) wurden mit einer Mischung aus 30 g Kieselgel GF₂₅₄ (Fa. Merck) und 60 ml 0,033 M Kaliumphosphatpuffer pH = 5,2 (KALDEWEY, 1967) nach STAHL (1967) mit einem Streichgerät (Fa. Desaga) beschichtet. Die Schichtdicke der 5 Platten betrug 0,25 mm. Die trockenen Platten mußten 1 Std. bei 110°C im Trockenschrank aktiviert werden.

Zur quantitativen Chromatographie der IES wurden die eingeengten Ätherextrakte (5.a., 5.b.) 3 mal in je 0,5 ml Aceton dest. gelöst und auf die gepufferten Kieselgelplatten aufgetragen. Als Vergleich und zur rechnerischen Auswertung der Proben wurden von einer IES-Eichlösung (10 mg IES/10 ml Aceton) unterschiedliche Mengen im Bereich von 2 bis 7 µg IES mit Kapillarpipette (Minicaps, Fa. EM Hirschmann, Labor Glas) auf den DC-Platten mit aufgetragen.

Zur Chromatographie der p-Cumarsäure wurde von einer Stammlösung von 100 mg Cumarsäure, der Indolyl-Brenztraubensäure von 5 mg Indolyl-Pyruvat jeweils auf 10 ml Aceton ausgegangen. Von der Abscisinsäure wurden 10 mg/10 ml Aceton für die DC gelöst.

Entwicklung der DC-Platten:

Fließmittel : p.a. Butanon/n-Hexan = 35:65
Laufstrecke : 2 mal 5 cm/2 mal 10 cm (aufsteigend)
Sprühmittel : van Urk-Reagenz (vgl. 6.5.)
Farbreaktion : Blaufärbung der IES ($R_f = 0,42$)
IES-Bestimmung: nach 24 Std. Ausmessen der blauen IES-Farbflecke am Densitometer (vgl. 7.)

6.2. DC auf Kieselgelplatten G

a. Fertigplatten (Glas) mit Kieselgel G 60 F₂₅₄:

Zur Chromatographie des IES-Methylesters wurden Glasfertigplatten (10/20 cm) mit Kieselgel G 60 F₂₅₄ (Fa. Merck) in Fließmittel I und II (vgl. 6.4.) verwendet.

Sprühmittel: van Urk-Reagenz (vgl. 6.5.)

b. selbstgestrichene Glasplatten mit Kieselgel G:

Zur Chromatographie der gebundenen IES des Wasserextraktes aus mit n-Butanol entfetteten Haferkaryopsen wurden Glasplatten (20/20 cm) mit Kieselgel G (Fa. Merck) verwendet und anschließend in Fließmittel VIII bis X (vgl. 6.4.) entwickelt.

Sprühmittel: van Urk-Reagenz, Ninhydrin, Anilin-Diphenylamin, Orcin/H₂SO₄ (vgl. 6.5.).

6.3. DC auf Aluplatten

a. Aluplatten mit Kieselgel Si:

Auf Aluplatten mit Kieselgel Si (Fa. Riedel de Häen) wurden die IES-Methylesterfraktionen chromatographiert, die vor dem GC-Lauf über DC gereinigt werden mußten. Nach Entwicklung der Platten in Fließmittel II (vgl. 6.4.) wurde in den zu untersuchenden Zonen (Identifizierung unter UV oder durch Ansprühen eines IES-Methylester-Vergleichsfleckes mit van Urk) das Kieselgel abgekratzt, dieses 3 mal mit Aceton p.a./Essigester p.a. = 1:1 eluiert, in der Tischzentrifuge (Fa. Hettich, EBA 3S) das Kieselgel abzentrifugiert, danach die gesammelte Flüssigkeit mit N₂ eingengt und der Rückstand für die Gaschromatographie in n-Hexan/Aceton (1:1) aufgenommen.

b. Alufolie mit Kieselgel GF:

Zur Chromatographie der gebundenen IES im Wasserrohextrakt aus Haferkaryopsen wurde eine Alufolie (Rolle, Fa. Merck), beschichtet mit Kieselgel GF, in den Fließmittelsystemen I bis VII und VIIa (vgl. 6.4.) verwendet.

Sprühmittel: van Urk-Reagenz, Ninhydrin, Anilin-Diphenylamin (vgl. 6.5.)

6.4. Fließmittelsysteme für DC

I	= Ammoniak (25 %)/Essigester/Propanol-2	= 20:45:35
II	= Aceton/Benzol	= 10:90
III	= n-Butanol/Eisessig/H ₂ O	= 40:10:10
IV	= Chloroform/Methanol/H ₂ O	= 85:14:1
V	= Äthylacetat/Butanon-2/Äthanol/H ₂ O	= 5: 3:1:1
VI	= n-Butanol/3 %iger NH ₃	= 90:44

VII	= Chloroform/Methanol/H ₂ O	= 3: 5: 2
VIIa	= Chloroform/Methanol/H ₂ O/Aceton	= 15:25:10:1
VIII	= Tetra/Äthanol/H ₂ O/Methanol/Aceton	= 20:72:20:5:4
IX	= Tetra/Äthanol/H ₂ O/Aceton	= 12:35: 8:2
X	= Isopropanol/H ₂ O/Äthylacetat	= 54:26:20

6.5. Sprühareagenzien für DC

a. van Urk-Reagenz für Indol-Derivate (modif. nach STAHL, 1967):

1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in 50 ml HCl (36 %) gelöst und 50 ml Äthanol (96 %) zugegeben.

Bemerkung: Vor dem Ansprühen muß die Platte nach Abdampfen flüchtiger basischer Komponenten des Fließmittels für 2-3 Min. bei 110°C im Trockenschrank erwärmt werden. Nach dem Ansprühen färben sich IES und IES-Verbindungen allmählich blau an.

b. Ninhydrin für Aminosäuren, Amine und Aminosucker:

0,2 g Ninhydrin werden in 100 ml Äthanol gelöst.

Nachbehandlung: Platte bei 110°C im Trockenschrank erwärmen bis zur optimalen Farbentwicklung (rot-braune Färbung) der Flecken.

c. Anilin-Diphenylamin für Zucker (KOCOUREK et al., 1966):

1 g Diphenylamin und 1 ml Anilin werden in 50 ml Aceton gelöst. Bei der Zugabe von 5 ml Phosphorsäure konz. kräftig schütteln, damit der sich bildende Niederschlag wieder in Lösung geht. Im Dunkeln und bei 2-5°C ist das Reagenz 2-3 Wochen haltbar.

Nachbehandlung: Platte bei 80-100°C im Trockenschrank ca. 15 Minuten erwärmen bis zur optimalen Farbentwicklung. 1,4-Aldohexoseoligosaccharide werden blau angefärbt, während Fructose sich bräunlich verfärbt. Galaktinol, Gluconsäure, Glucosamin und Inosit färben sich nicht an.

d. Orcin/H₂SO₄ für Zucker:

200 mg Orcin werden in 100 ml 75 %iger H₂SO₄ gelöst.

Nachbehandlung: Feuchte Platte bei 100-120°C im Trockenschrank erwärmen. Nach ca. 5 Minuten färben sich Zucker gelbbraun bzw. blauschwarz an.

7. Densitometrie

Am Densitometer TLD 100 (Fa. Vitatron) in Verbindung mit dem Schreibgerät UR 400-Integrator wurden die Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 583 nm im Durchlicht ausgeführt. Die Meßwerte wurden dabei als Flächenintegrale ausgedrückt. Die Schubgeschwindigkeit des Densitometers betrug 1 cm/min, der Vorschub des Schreibers 2 cm/min, geeicht wurde auf 12 Anschläge/cm².

7.1. Ausmessen der IES-Flecke nach DC

Bei der densitometrischen Auswertung von IES auf DC-Platten wurden pro Platte die Farbflecke einer Ätherextraktion jeweils einzeln ausgemessen. Dabei ergab sich bei der Ausmessung eines Farbfleckes im Bereich von 2-10 µg IES ein Fehler von $\pm 2\%$ (SCHMALTZ, 1973). Da außerdem der IES-Wiederfund nach Ätherextraktion nur $50 \pm 2\%$ (KNEGT u. BRUINSMA, 1973) beträgt, ergab sich z.B. bei der IES-Bestimmung einer Extraktion mit 3 Flecken auf der Platte ein Maximalfehler von $\pm 8\%$.

7.2. Ausmessen der Gelbanden nach Elektrophorese

Nach Elektrophorese konnten die mit Coomassieblau angefärbten (Disc-Elektrophorese) oder mit 20 %iger TCA ausgefällten (Focussierung) Gelproteinbanden am Densitometer zur prozentualen Proteinbestimmung ausgemessen werden. Die Gele wurden dazu in einer Schablone vom Lichtstrahl in Längsrichtung abgetastet, wobei sich oberhalb eine Lochblende von 1 mm und unterhalb des Geles eine Spaltblende von 2,5/0,25 mm befand. Die aufgezeichneten Densitogramme ließen sich durch Integration der Kurven auswerten und damit konnte der prozentuale Proteingehalt der einzelnen Gelbanden ermittelt werden.

8. Biotest

Zur Durchführung des Zylindertestes mit Weizenkoleoptilen wurden Petrischalen (ϕ 7,5 cm) mit je 15 ml Lösung beschickt. Für die Eichkurve, die aus Gründen der Genauigkeit für jeden Test neu mit angesetzt werden mußte, da Alter, Größe und Beschaffenheit der Koleoptilen immer etwas schwankten, wurde ausgehend von einer

10^{-3} M IES-Stammlösung (8,76 mg IES/50 ml H_2O dest.) eine Verdünnungsreihe bis 10^{-8} M hergestellt. Als Kontrolle wurde zusätzlich eine Petrischale mit 15 ml dest. Wasser gefüllt. Für die jeweiligen Eluatkurven wurden die Petrischalen ebenfalls mit je 15 ml Eluatlösung der verschiedenen Konzentrationen gefüllt. In die so vorbereiteten Schalen wurden auf einmal je 30 frisch geschnittene Weizenkoleoptilzylinder von je 10 mm Länge gegeben. Die mit Deckel verschlossenen Petrischalen mußten 24 Stunden lang im Dunkeln bei Raumtemperatur geschüttelt werden. Danach ließen sich die Koleoptillängen unter dem Binokular auf Millimeterraster exakt ausmessen.

8.1. Gewinnung der IES-Eluatlösungen

a. authentische IES-Lösung:

3,5 mg IES, gelöst in 2,5 ml Aceton, wurden bandförmig auf eine gepufferte Kieselgelplatte GF₂₅₄ aufgetragen. Nach der Entwicklung der Platte wurde die IES, deren Lage sich entweder mittels van Urk oder kurzzeitigem UV-Licht bestimmen ließ, mit dem Kieselgel von der Platte abgekratzt und das Kieselgel mit insgesamt 20 ml dest. Wasser 3 mal gewaschen. Nach Abzentrifugation des Kieselgels in der Tischzentrifuge lagen 20 ml einer 10^{-3} M IES-Lösung ($\hat{=}$ 3,5 mg/20 ml) für den Biotest vor.

b. Lösung der freien IES aus Haferkaryopsen:

Nach der Methanolextraktion aus 37,5 g Karyopsen ($\hat{=}$ 50 g Körnern), anschließender saurer Ätherextraktion und DC wurde die IES, deren Lage mit UV-Licht bestimmt wurde, ebenfalls mit insgesamt 20 ml dest. Wasser wie die authentische IES von der Platte eluiert. Da der Gehalt an freier IES in 50 g Körnern mit 28,5 μ g bestimmt worden war (Tab. 2), nach Ätherextraktion und DC wegen des 50 %igen Arbeitsverlustes (KNEGT u. BRUINSMA, 1973; SCHMALTZ, 1973) aber nur mehr 14,25 μ g IES vorlagen, hatten die 20 ml IES-Eluatlösung nach DC eine Molarität von $0,41 \times 10^{-5}$ M (14,25 μ g IES/20 ml).

c. Lösung der IES-Gesamtmenge aus Haferkaryopsen:

Aus dem Hydrolysat von 3 g Karyopsen ($\hat{=}$ 4 g Körnern) mit anschließender Ätherextraktion wurde nach DC die freigesetzte IES wie unter 8.1.a. nur mit insgesamt 15 ml dest. Wasser von der Platte eluiert. Da auf der Platte 30,52 μ g IES vorlagen, hatten die 15 ml Eluatlösung eine IES-Molarität von $1,14 \times 10^{-5}$ M (30,52 μ g/15 ml).

d. Lösung aus freier IES + authentischer IES:

Diesmal wurde die freie IES (8.1.b.) anstelle von 20 ml mit nur 15 ml dest. Wasser von der DC-Platte eluiert, d.h. 14,25 μ g IES lagen in 15 ml Lösung vor. Damit betrug die Molarität dieser Lösung $0,54 \times 10^{-5}$ M IES. Durch Zugabe einer $0,5 \times 10^{-3}$ M authentischen IES-Lösung (0,15 ml $\hat{=}$ 13,14 μ g IES) im Verhältnis 1:100 (v:v) zur freien IES-Eluatlösung (14,85 ml $\hat{=}$ 14,11 μ g IES) resultierte eine $1,03 \times 10^{-5}$ M IES-Lösung (15 ml $\hat{=}$ 27,25 μ g IES) als Ausgangslösung für den Biotest.

e. Lösung aus IES-Gesamtmenge + authentischer IES:

Ebenfalls von 3 g Karyopsen ($\hat{=}$ 4 g Körnern) ausgehend wurde nach DC ein IES-Eluat mit einer Molarität von $1,14 \times 10^{-5}$ hergestellt (vgl. 8.1.c.). Durch Zugabe von 10^{-1} M authentischer IES-Lösung (0,15 ml $\hat{=}$ 2,628 mg IES) im Verhältnis 1:100 (v:v) zum Eluat der IES-Gesamtmenge (14,85 ml $\hat{=}$ 30 μ g IES) wurde eine $1,01 \times 10^{-3}$ M IES-Ausgangslösung (15 ml $\hat{=}$ 2,658 mg IES) für den Biotest erhalten.

8.2. Statistische Auswertung des Biotests (t-Signifikanztest)

Um eine Aussage zu den einzelnen Ergebnissen der Biotests machen zu können, mußten die Werte gegeneinander statistisch abgesichert werden. Diesen Berechnungen lag folgende Formel zugrunde:

$$m = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n(n-1)}} \quad \bar{x} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n x_i$$

$\bar{x}$ = arithmetrische Mittel

n = Zahl der Einzelwerte

x_i = ermittelte Zuwachsgrößen

m = mittlere Fehler des arithmetrischen Mittels

Dieser mittlere Fehler m des arithmetrischen Mittels ist ein Maß für die Streubreite des Mittelwertes. Um unterscheiden zu können, ob die Mittelwerte 2er Zuwachsgrößen wirklich verschieden sind, muß die Wahrscheinlichkeit für den Unterschied oder der Grad der Signifikanz berechnet werden. Dies ist mit Hilfe der Prüffunktion t möglich (t -Test oder Student-Test).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_D} \quad S_D = \sqrt{\frac{\sum a_1^2 + \sum a_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

S_D = mittlere Fehler der Differenz der beiden Mittelwerte
(Indizes 1 und 2 beziehen sich auf die beiden betrachteten Meßreihen; $a = \bar{x} - x_i$)

Die statistische Sicherheit für den Unterschied der beiden Mittelwerte ist umso größer, je größer der Wert t ist. Aus der Tabelle der t -Verteilung (BASLER, 1973) kann geschlossen werden, welchen Wert t bei einer entsprechenden Zahl von Freiheitsgraden f ($f = n_1 + n_2 - 2$) und bei bestimmten Sicherungsgrenzen mindestens haben muß. Liegt der errechnete t -Wert numerisch über dem theoretischen, dann ist der Unterschied mit der entsprechenden Sicherheit wahrscheinlich. Der Grad der Irrtumswahrscheinlichkeit wird durch den α -Wert ausgedrückt. Ist $\alpha \geq 2,5 \%$, so liegt kein statistisch gesicherter Unterschied der beiden betrachteten Werte vor, erst ab $\alpha \leq 1 \%$ sind die Werte statistisch gesehen gegeneinander abgesichert ($\alpha = 1 \%$ entspricht $t_{99,00\%}$, was einer Sicherheitswahrscheinlichkeit für den Unterschied von 99 % entspricht).

9. Darstellung von Diazomethan

In einen 50 ml Destillierkolben mit langem Ansatz, Tropftrichter und ausreichender Kühlung wird eine Lösung von 3 g KOH in 5 ml dest. Wasser, 17 ml "Carbitol" (Diäthylenglykolmonoäthyläther, Fa. Merck) und 5 ml Äther dest. gegeben und die Mischung im Wasserbad auf 70-75°C erhitzt. Sobald der Äther zu destillieren beginnt, wird tropfenweise eine Lösung von 10 g N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid in ca. 60 ml Äther dest. innerhalb 1/4 Stunde zugegeben. Während der Destillation muß im Destillationskolben gerührt werden, wobei sich das Destillat in einer gekühlten Vorlage sammelt. Diese ätherische Lösung von Diazomethan muß bei möglichst tiefen Temperaturen aufbewahrt werden.

10. Gaschromatographie des IES-Methylesters

a. Methylierung der IES:

Zur Überführung der freien Säure in ihren Methylester versetzt man 1 ml der ätherischen Lösung (absoluter Äther) von IES mit 2 ml bidest. Methanol und einer Lösung von Diazomethan in Äther, bis eine Gelbfärbung bestehen bleibt. Bei vorzeitigem Verschwinden der Gelbfärbung wird noch etwas Diazomethan zugesetzt. Nach ca. 2 Stunden engt man die Lösung mit N₂ ein, nimmt den Rückstand in einem definierten Volumen an n-Hexan p.a./Aceton p.a. (1:1) auf und verwendet diese Lösung zur gaschromatographischen Bestimmung.

b. Bedingungen am GC:

Gerät	: Varian Aerograph Series 1800
Säule	: Glassäule (l = 1,5 m), Silikon SE 52 auf Gaschrom Q
Detektor	: Flammenionisationsdetektor (FID)
Trärgas	: N ₂
Injektionstemperatur	: 195°C
Detektortemperatur	: 200°C
Einspritzmenge	: maximal 4 µl Lösung

Retentionszeiten (R.Z.) des IES-Methylesters bei unterschiedlichen Säulentemperaturen (T_S) und Gasbedingungen:

ml / min			T _S °C	R.Z. min
N ₂	H ₂	Luft		
140	40	300	155	10,5
135	50	300	150	13,5
135	50	400	150	13,6

11. Methoden zur Isolierung verschiedener IES-haltiger Fraktionen aus Haferkaryopsen

11.1. Extraktion mit 10 %iger NaCl-Lösung und Auftrennung des IES-haltigen Überstandes

a. NaCl-Puffer-Extraktion:

30 g gemahlene Karyopsen werden in 285 ml 10 %iger NaCl-Lösung + 15 ml 1 M K-Phosphatpuffer pH = 7,8 (= 300 ml) bei 4°C im Dunkeln 48 Std. auf einem Magnetrührgerät gerührt. Danach wird der Ansatz über ein Teesieb abfiltriert und die Lösung 60 min. bei 16500 UpM und 4°C in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Das auf der klaren Lösung schwimmende Fett läßt sich durch Abgießen über Watte entfernen.

Mit diesem Überstand wurde eine fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung bei 0°C durchgeführt:

Dazu wird das Volumen bestimmt und festes, fein zerriebenes Ammonsulfat bis zur jeweiligen prozentualen Sättigung zu der in Eiswasser stehenden Lösung langsam unter Rühren zugegeben und diese danach noch weitere 30 min. gerührt. Die ausgefallenen Proteine werden dann in der Kühlzentrifuge 30 min. bei 16500 UpM abzentrifugiert. Nach Einstellen des Überstandes auf pH = 7,0 mit NH_3 konz. wird das Volumen der Lösung erneut bestimmt und der nächste Fällungsschritt damit durchgeführt.

Sowohl zur Entsalzung als auch zur Auftrennung des Rückstandes der 20-60 %-Fällung über Biogel P-2 (Fa. BioRad, 100-200 mesh) wurden die ausgefällten und abzentrifugierten Proteine in 30 ml 10^{-3} M K-Phosphatpuffer pH = 7,0 gepottert und danach 30 min. bei 20000 UpM zentrifugiert und abfiltriert. Der Rückstand enthielt denaturierte Proteine. Von der Hälfte der klaren Lösung wurde zur Kontrolle sofort eine IES-Bestimmung durchgeführt, die andere Hälfte über eine Biogel P-2 Säule (2,5/70 cm, Durchfluß: 100 ml/h) entweder mit dest. Wasser entsalzt oder mit 10^{-3} M K-Phosphatpuffer pH = 7,0 aufgetrennt und in den jeweils eluierten Fraktionen ebenfalls der IES-Gehalt bestimmt.

b. NaCl-Puffer-Extraktion mit Zusatz von Ascorbinsäure und PMSF:

60 g gemahlene Karyopsen werden in 600 ml 10 % NaCl/ 10^{-1} M Imidazol/ 10^{-2} M Ascorbinsäure/ 10^{-5} M PMSF-Puffer pH = 7,0 wie unter 11.1.a. extrahiert und die Proteine des Überstandes ebenfalls fraktioniert mit Ammonsulfat bei 0°C gefällt.

Zur Abtrennung des Sulfats vom 20-100 % Proteinniederschlag wurde dieser 2 mal in je 30 ml 10^{-1} M oder 10^{-2} M Imidazol-puffer/ 10^{-5} M PMSF pH = 7,0 gepottert, danach 20 min. bei 20000 UpM in der Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert und die beiden vereinten Überstände, wovon ein Aliquot zur sofortigen IES-Bestimmung hydrolysiert wurde, jeweils auf eine Biogel P-2 Säule (5/35 cm, Durchfluß: 200 ml/h) aufgetragen. Zur Säulenchromatographie wurde ebenfalls sowohl 10^{-1} M als auch 10^{-2} M Imidazol/ 10^{-5} M PMSF-Puffer pH 7,0 verwendet (siehe Schema 2).

Nach der Säulentrennung mit 10^{-1} M Puffer wurde 1/5 des Eluates des SO_4^{2-} -freien 1. Proteinpeaks der P-2 Säule zur IES-Bestimmung hydrolysiert, die restliche Lösung sofort auf eine DEAE 23 SS-Cellulose-Säule (Fa. Serva) aufgetragen (2,4/20 cm, Pumpe: 90 ml/h), die mit 10^{-1} M Imidazol/ 10^{-5} M PMSF-Puffer pH = 7,0 equilibriert worden war. Der anschließend verwendete lineare Salzgradient betrug 0-0,5 M KCl im Puffer. Mit allen eluierten Peaks wurde eine IES-Bestimmung durchgeführt.

Nach der Auftrennung der mit Ammonsulfat (20-100 %) gefällten Proteine über Biogel P-2 mit 10^{-2} M Puffer wurde das Eluat des sulfatfreien ersten P-2 Peaks im Batch-Verfahren auf DEAE-Sephadex A 50 (Fa. Pharmacia) in 10^{-2} M Imidazol/ 10^{-5} M PMSF-Puffer pH = 7,0 aufgetragen und mit einem 0-1 M (0,25; 0,4; 1 M) linearen KCl Gradienten im Puffer getrennt. Mit jeder Fraktion wurde anschließend eine IES-Bestimmung durchgeführt. Das Eluat des zweiten P-2 Peaks der Biogel P-2 Säule wurde bis 100 % Sättigung mit Ammonsulfat versetzt, 30 min. bei 16500 UpM in der Kühlzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert, der Proteinrückstand in 25 ml 10^{-2} M Puffer gepottert, wieder 20 min. bei 20000 UpM zentrifugiert und der Überstand bei 4°C

dialysiert gegen $4 \text{ l } 10^{-2} \text{ M Imidazol}/10^{-5} \text{ M PMSF-Puffer pH} = 7,0$ (Dialyseschlauch: Visking-Typ C/110, Fa. Serva). Anfangs wurde der Puffer alle 2 Stunden gewechselt. Nach 48 Stunden wurde die Dialyse abgebrochen, obwohl in der klaren Proteinlösung noch Spuren von SO_4^{2-} (Nachweis mit BaCl_2/HCl) vorlagen. Auch damit wurde eine IES-Bestimmung durchgeführt.

11.2. Wasserextraktion mit dem Rückstand des NaCl-Puffer-Ansatzes und anschließende Gelfiltration

a. Wasserextraktion:

50 g Karyopsenmehl werden in 500 ml $10 \% \text{ NaCl}/10^{-2} \text{ M Na-Phosphatpuffer pH} = 7,0$ 12 Stunden bei 4°C im Dunkeln gerührt und anschließend wird der Ansatz 30 min. bei 16500 UpM in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Aus dem Rückstand läßt sich dann mittels Wasserextraktion eine IES-haltige Fraktion gewinnen, wobei dieser in 160 ml dest. Wasser 1 Stunde im Dunkeln bei 4°C gerührt und dieser wäßrige Extrakt dann 30 min. bei 16500 UpM zentrifugiert werden muß. Der Überstand wird kaltgestellt, während mit dem Rückstand die Wasserextraktion wiederholt wird. Die beiden vereinigten Überstände (= 320 ml) müssen in der UZ bei 30000 UpM 60 min. bei 2°C zentrifugiert werden. Der klare Überstand, verteilt auf 5 Kolben, läßt sich danach zur Konservierung lyophilisieren und bis zur weiteren Aufarbeitung im Tiefkühlfach aufbewahren.

b. Gelfiltration:

Zur Auftrennung des lyophilisierten Extraktes (ca. 710 mg Δ 10 g Karyopsen) wurde dieser in 12 ml Säulenpuffer gelöst, 1 Stunde bei 2°C in der UZ bei 40000 UpM klarzentrifugiert und der Überstand sowohl auf eine Ultrogel AcA 54 (Fa. LKB)- als auch Sephadex G 50-medium (Fa. Pharmacia)-Säule aufgetragen.

<u>Ultrogel AcA 54</u>	: 5/40 cm
Trennbereich	: 6000-70000 Daltons
Puffer	: $10^{-2} \text{ M Na-Phosphatpuffer, pH} = 7,0/$ $10^{-4} \text{ M Hydrochinon}$
Durchfluß	: 70 ml/h
Fraktionen	: 6 ml

Zur Eichung dieser Säule wurden folgende Substanzen, zusammen gelöst in 12 ml Säulenpuffer, aufgetragen:

Cytochrom c (MG: 12500) : 10 mg

Huhnserumalbumin (MG: 45000) : 20 mg

Rinderserumalbumin (MG: 67000) : 20 mg

Sephadex G 50 : 5/90 cm (5/42 cm)

Trennbereich : 1500-30000 Daltons

Puffer : $5 \times 10^{-2} \text{ M Na-Phosphatpuffer/}$
 $10^{-4} \text{ M Hydrochinon pH} = 7,0$

Durchfluß : 80 ml/h (70 ml/h)

Fraktionen : 10 ml

Die Entsalzung des gefriergetrockneten 3. AcA-Peaks, der dazu in 20 ml bidest. Wasser gelöst wurde, als auch des Roh-extraktes, gelöst in 10 ml bidest. Wasser, geschah mittels Gelfiltration über Biogel P-2 (Fa. BioRad). Es wurden maximal 10 ml Lösung auf die Säule aufgetragen.

Biogel P-2 : 5/20 cm

Elutionsmittel : bidest. Wasser

Durchfluß : 600 ml/h

PO_4^{3-} -Nachweis : $3 \text{ AgNO}_3 + \text{PO}_4^{3-} \longrightarrow \text{Ag}_3\text{PO}_4 \downarrow (\text{gelb}) + 3 \text{ NO}_3^-$

Cl^- -Nachweis : $\text{AgNO}_3 + \text{Cl}^- \xrightarrow{\text{H}_2\text{SO}_4} \text{AgCl} \downarrow (\text{weiß}) + \text{NO}_3^-$

Die eluierten Peakfraktionen wurden immer sofort lyophilisiert (außer bei sofortiger IES-Bestimmung) und erst mit dem gefriergetrockneten Material wurde weitergearbeitet.

11.3. Wasserextraktion nach Entfetten der Karyopsen mit n-Butanol und anschließende Ionenaustauscherchromatographie des Roh-extraktes

a. Wasserextraktion:

20 g Karyopsenmehl werden mit 80 ml eiskaltem, wassergesättigtem n-Butanol im vorgekühlten 250 ml Becher gemixt (Fa. Warring Blendor). Der gesamte Ansatz wird anschließend in der Tischzentrifuge bei voller Geschwindigkeit für 10 min. in im Tiefkühlfach bei -20°C vorgekühlten Bechern abzentrifugiert.

Der gelblich, klare Überstand wird verworfen, während der Rückstand im Eisbad mit 80 ml eiskaltem bidest. Wasser in einem hohen 250 ml Becherglas für 5 min. gerührt wird, wobei starkes Schäumen vermieden werden sollte. Anschließend folgt die 10 minütige Zentrifugation unter den bereits gegebenen Bedingungen. Der weißlich-trübe Überstand wird sofort im Kühlschrank aufbewahrt und der Rückstand wieder mit 80 ml eiskaltem bidest. Wasser extrahiert. Nach insgesamt 5 successiven Wasserextraktionen ist die wasserlösliche, gebundene IES quantitativ aus dem Karyopsenmehl gelöst. Die 5 vereinigten und mit einem Glasstab gut durchmischten Wasserfraktionen werden auf 4 Kolben verteilt (Δ je 5 g Karyopsen), lyophilisiert und anschließend im Tiefkühlfach aufbewahrt.

Bei dieser Extraktionsmethode ist besonders darauf zu achten, sehr schnell und zügig zu arbeiten, damit sowohl der Karyopsenrückstand als auch die Extrakte immer einer Temperatur um unter 4°C ausgesetzt sind. Ebenso sollte darauf geachtet werden, wie stets bei Arbeiten mit IES, ständig direkte Lichteinstrahlung (UV!) zu vermeiden.

b. Ionenaustauscherchromatographie:

Zur Ionenaustauscherchromatographie wurde der Rohextrakt von je 5 g Karyopsen verwendet. Dieser mußte, wie bei jeder sich anschließenden Aufarbeitung dieses Wasserextraktes, zunächst im jeweiligen kalten Säulenpuffer (10 ml) gelöst und in der UZ bei 40000 UpM 1 Stunde bei 2°C klarzentrifugiert werden. Sowohl der Rückstand als auch die nach Chromatographie des klaren Überstandes erhaltenen Säuleneluate wurden auf IES getestet. Der Überstand wurde versucht, sowohl im Batch-Verfahren über CM S 23-Cellulose (Puffer: 10^{-1} N Na-Acetat pH = 5,0; Gradient: 0,1 N bis 1,0 N NaCl im Puffer) als auch mittels Säulenchromatographie bei 4°C aufzutrennen.

CM S 23-Cellulose (= Carboxymethylcellulose, Fa. Serva):

- | | |
|------------|--|
| 1. Säule | : 1,5/11,5 cm |
| Puffer | : 2×10^{-2} N Na-Acetat, pH = 5,0 |
| Durchfluß | : 17 ml/h |
| Fraktionen | : 8 ml |
| Gradient | : 0-0,25 N (linear) NaCl in 100 ml Puffer |

2. Säule : 1,5/10 cm
Puffer : 10^{-2} M Na-Acetat pH = 5,0
Durchfluß : 16,5 ml/h
Fraktionen : 8 ml
Gradient : 0-0,5 N NaCl (linear) in 120 ml Puffer

Bio-Rex 70 (minus 400 mesh-Na-Form, Fa. BioRad):

Säule : 1,5/14 cm
Puffer : 10^{-2} N Na-Acetat pH = 4,0
Durchfluß : 17 ml/h
Fraktionen : 8 ml
Gradient : 0-1 M KCl (linear) in 100 ml Puffer

DEAE 23 SS-Cellulose (= Diäthylamino-äthylcellulose,
Fa. Serva):

1. Säule : 1,5/11,5 cm
Puffer : 2×10^{-2} M Tris-HCl pH = 8,0
Durchfluß : 17 ml/h
Fraktionen : 8 ml
Gradient : 0-0,25 N NaCl (linear) in 100 ml Puffer

2. Säule : 1,5/10 cm
Puffer : 10^{-2} M Tris-HCl pH = 7,85
Durchfluß : 16,5 ml/h
Fraktionen : 8 ml
Gradient : 0-0,5 N NaCl (linear) in 120 ml Puffer

12. Auftrennung des Wasserextraktes von entfetteten Hafer-
karyopsen mit Isolierung einer IES-haltigen Zuckerfraktion
nach successiven Gelfiltrationen

12.1. Säulenchromatographie des Rohextraktes bei 4°C

Der zunächst immer bei 0°C in ca. 9,5 ml Säulenpuffer gelöste und anschließend in der UZ (40000 UpM, 1 Std. bei 2°C) klar-zentrifugierte, IES-haltige Rohextrakt (ca. 450 mg Δ 5 g Karyopsen) wurde sowohl über Ultrogel AcA 54 (Fa. LKB) als auch Sephadex G 50-medium (Fa. Pharmacia) aufgetrennt.

Ultrogel AcA 54: 5/38 cm
Trennbereich : 6000-70000 Daltons
Puffer : 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer/ 10^{-4} M Hydrochinon
pH = 7,0
Auftragsvolumen: 9,5 ml
Durchfluß : 75 ml/h
Fraktionen : 6 ml

Zur Eichung dieser Säule wurden folgende Substanzen, gelöst im Säulenpuffer (9,5 ml), aufgetragen:

Rinderserumalbumin (MG: 67000): 20 mg
Huhnserumalbumin (MG: 45000): 20 mg
Ribonuclease A (MG: 13600): 10 mg
Cytochrom c (MG: 12500): 5 mg

Sephadex G 50 : 0,9/50 cm
Trennbereich : 1500-30000 Daltons
Puffer : 5×10^{-2} M Na-Phosphatpuffer/ 10^{-4} M Hydrochinon pH = 7,2
Auftragsvolumen: 0,3 ml
Durchfluß : 4 ml/h
Fraktionen : 1 ml

Die eluierten Peakfraktionen wurden immer sofort lyophilisiert (außer bei sofortiger IES-Bestimmung) und erst mit dem gefriergetrockneten, IES-haltigen Material wurde weitergearbeitet.

12.2. Säulenchromatographie der ersten P-2 Fraktion (= entsalzter 3. AcA Peak) bei 4°C

Die lyophilisierte erste P-2 Fraktion wurde immer in Hydrochinonhaltigem Puffer (10^{-2} M Na-Phosphatpuffer/ 10^{-4} M Hydrochinon pH = 7,0) bei 0°C gelöst und danach die Auftrennung über die Gele Sephadex G 50-fine (Fa. Pharmacia), Biogel P-10, P-4: 200-400 mesh, P-2 (Fa. BioRad) und auch über Concanavalin A-Sephrose (Fa. Pharmacia) durchgeführt.

Sephadex G 50 : 0,9/85 cm
Trennbereich : 1500-30000 Daltons
Puffer : 10^{-2} M Imidazol/ 10^{-1} M KCl pH = 7,0
Auftragsvolumen: 0,1 ml (1/4 der ersten P-2 Probe Δ 1,25 g Karyopsen)
Durchfluß : 4,1 ml/h
Fraktionen : 2 ml

Zur Eichung dieser Säule wurden folgende Substanzen, gelöst in je 0,2 ml 5×10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0 auf die Säule aufgetragen:

α -Chymotrypsin (MG: 25300)	:	2 mg
Trypsin (MG: 23300)	:	2 mg
Myoglobin-Pferd (MG: 17800)	:	1 mg
Ribonuclease A (MG: 13600)	:	2 mg
Cytochrom c (MG: 12500)	:	1 mg
Insulin (MG: 6000)	:	1,5 mg

<u>Biogel P-10</u>	:	2,3/75 cm
Trennbereich	:	1500-20000 Daltons
Puffer	:	5×10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0
Auftragsvolumen	:	1,5 ml (erste P-2 Probe Δ 5 g Karyopsen), 1,8 ml (erste P-2 Probe Δ 10 g Karyopsen)
Durchfluß	:	31 ml/h
Fraktionen	:	5 ml

Zur Eichung dieser Säule wurden folgende Substanzen, gelöst in je 1,5 ml 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer/ 10^{-4} M Hydrochinon pH = 7,0, auf die Säule aufgetragen:

Myoglobin-Pferd (MG: 17800)	:	5 mg
Cytochrom c (MG: 12500)	:	2 mg
Insulin (MG: 6000)	:	5 mg
Insulin B (MG: 3495)	:	4 mg
Insulin A (MG: 2532)	:	2 mg
Vitamin B 12 (MG: 1355)	:	2 mg

<u>Biogel P-4</u>	:	2,4/70 cm
Trennbereich	:	800-4000 Daltons
Puffer	:	5×10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0
Auftragsvolumen	:	1,5 ml (erste P-2 Probe Δ 5 g Karyopsen)
Durchfluß	:	29 ml/h und 15 ml/h
Fraktionen	:	5 ml

<u>Biogel P-2</u>	:	0,9/90 cm
Trennbereich	:	100-1800 Daltons
Puffer	:	5×10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0
Auftragsvolumen	:	1,5 ml (erste P-2 Probe Δ 5 g Karyopsen)
Durchfluß	:	6 ml/h
Fraktionen	:	1,5 ml

Con-A-Sepharose : 1,6/14 cm

a. Adsorption

Puffer : 10^{-2} M Na-Acetat/5 mM NaCl/1 mM CaCl_2 ,
 MgCl_2 , MnCl_2 , pH = 6,2

Auftragsvolumen : 1,5 ml (erste P-2 Probe Δ 5 g Karyopsen)

Durchfluß : 20 ml/h

b. Desorption

Puffer : 0.8 M Glucose im Puffer

Durchfluß : 70 ml/h

Fraktionen je : 5 ml

12.3. Säulenchromatographie der salzfreien zweiten P-10 Fraktion bei 4°C

Der lyophilisierte, salzfreie Teil der zweiten P-10 Fraktion (Δ 5 g Karyopsen) wurde jeweils in 1,5 ml 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer/ 10^{-4} M Hydrochinon pH = 7,0 gelöst und mittels Gelfiltration über Biogel P-4 sowie P-2 (Fa. BioRad) aufgetrennt.

Biogel P-4:

a. 200-400 mesh : 2,6/65 cm

b. 100-200 mesh : 1,0/75 cm

Trennbereich : 800-4000 Daltons

Puffer : 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0

Auftragsvolumen : 1,5 ml

a. Durchfluß : 20,5 ml/h

b. Durchfluß : 4,0 ml/h

a. Fraktionen : 5 ml

b. Fraktionen : 1 ml

Zur Eichung der Säule a. dienten die in je 1,5 ml 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer/ 10^{-4} M Hydrochinon pH = 7,0 gelösten Substanzen:

Insulin B (MG: 3495) : 2,8 mg

Insulin A (MG: 2532) : 2,0 mg

Vitamin B 12 (MG: 1355): 2,0 mg

Zur Eichung der Säule b. wurden folgende Substanzen in je 0,3 ml Säulenpuffer gelöst:

Insulin B (MG: 3495) : 2,0 mg

Insulin A (MG: 2532) : 2,0 mg

Vitamin B 12 (MG: 1355): 0,8 mg

Hydrochinon (MG: 110) : 10^{-4} M

<u>Biogel P-2</u>	: 0,9/70 cm
Trennbereich	: 100-1800 Daltons
Puffer	: 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0
Auftragsvolumen	: 1,5 ml
Durchfluß	: 5 ml/h
Fraktionen	: 1,3 ml

12.4. Entsalzen der phosphathaltigen Säulenfraktionen mittels Gelfiltration bei 4°C

Alle lyophilisierten, phosphathaltigen Säulenfraktionen wurden über Biogel P-2 (Fa. BioRad), dessen Ausschluß bei 1800 Daltons liegt, mit bidest. Wasser als Elutionsmittel entsalzt, wobei die IES-haltigen Fraktionen zur Stabilisierung der IES immer in 10^{-4} M Hydrochinonlösung bei 0°C aufgelöst wurden.

Der gefriergetrocknete 3. AcA Peak ($\hat{A}$ 5 g Karyopsen) ließ sich in insgesamt 10 ml lösen, während der 1. (= 33 ml) und der 2. (= 24 ml) Peak der Con A-Säule ($\hat{A}$ 5 g Karyopsen) sofort nach Gelfiltration auf die Biogel P-2 Säule (5/20 cm) aufgetragen wurde. Der erste und zweite P-10 Peak ($\hat{A}$ 10 g Karyopsen) konnten wiederum nach Gefriertrocknung in 6 ml (1. Peak) und 8 ml (2. Peak) gelöst und über Biogel P-2 (2,4/70 cm) entsalzt werden. Benötigte man z.B. für Elektrophoresen oder PC sehr gut salzfreie Proben, so wurden die über die dicke P-2 Säule (5/20 cm) entsalzten Fraktionen nochmals über eine dünne P-2 Säule (0,9/30 cm) aufgetrennt, wobei sich maximal 2 ml Lösung auftragen ließen.

Biogel P-2:

Säule: cm	Durchfluß: ml/h	Auftragsvolumen: ml
5/20	600	12
2,4/70	60	10
0,9/30	30	2

13. Untersuchungen zur Charakterisierung der IES-haltigen Fraktionen anhand ihrer Inhaltsstoffe

13.1. Proteinbestimmungen

a. Biuretreaktion (ROSWELL, 1962):

Zur Proteinbestimmung mittels Biuretreaktion werden die Proben zur Fällung der Proteine mit den gleichen Volumina 20 %iger wäßriger TCA versetzt und kräftig geschüttelt. Nach 10 min. lassen sich die Proteine in der Tischzentrifuge abschleudern (5-10 min.). Das Pellet wird mit 1 ml 20 %iger TCA gewaschen, anschließend mit 5 ml Biuretreagenz versetzt und über Nacht stehengelassen. In der Lösung enthaltene Lipide können durch Ausschütteln mit 1 ml Petroläther (60-90°C) abgetrennt werden. Danach wird die Extinktion bei 540 nm gegen das Biuretreagenz am DMR 22 gemessen. Die Eichkurve stellt man mit einer Lösung aus Rinderserumalbumin (50 mg/50 ml dest. Wasser) auf, wovon zur Bestimmung je 3 Proben mit 1, 2, 3, 4 und 5 ml eingesetzt werden.

Biuretreagenz:

0,6 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ und 2,4 g Kaliumnatriumtartrat werden je in etwas dest. Wasser gelöst, beide Lösungen zu 120 ml 10 %iger NaOH gegeben und dann füllt man mit dest. Wasser auf 500 ml auf. Das Reagenz ist bei 4°C im Dunkeln ca. 3 Monate haltbar.

b. Proteinbestimmung, modifiziert nach LOWRY (1951):

Zur Proteinlösung (5-30 μl) werden 600 μl dest. Wasser und 10 μl DOC 1 % gegeben, gut gemischt und 15 min. stehengelassen. Danach fügt man 200 μl 22 %ige TCA zu und läßt die Lösung wieder 15 min. stehen. Mit der Mikroliterzentrifuge (Fa. Hettich) werden die gefällten Proteine 5 min. abzentrifugiert, wobei sich der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe absaugen läßt. Jetzt werden 50 μl 0,4 N NaOH und danach 1,0 ml alkalische Kupferlösung zugegeben. Nachdem die Lösung wieder 15 min gestanden ist, werden 100 μl Folin-Mischung (Fa. Merck, 10 min. vor Gebrauch 1:2 mit dest. Wasser verdünnen) für 30 min. im Dunkeln zugesetzt. Die Extinktion

bei 660 nm wird 30 min. nach Zugabe gegen einen Blindwert am Spektralphotometer gemessen. Die Eichkurve stellt man mit einer Lösung aus Rinderserumalbumin (1 mg/ml) im Bereich von 5-30 μ g auf.

alkalische Kupferlösung:

50 ml 2 %ige Na_2CO_3 -Lösung werden in 0,1 N NaOH gegeben, 0,5 ml 2 %ige Na-K-Tartratlösung zugefügt, dann gründlich gemischt und mit 0,5 ml 1 %iger $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung mindestens 5 min. geschüttelt (Lösung darf bei Verwendung nicht älter als 30 min. sein!).

c. Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976):

Zur Proteinlösung (0,1 ml) werden 5 ml verdünntes Farbreagens (Fa. BioRad, Protein Assay Kit) hinzugefügt und geschüttelt, wobei übermäßiges Schäumen vermieden werden sollte. Nach 5 min. (spätestens nach 1 Std.) wird die Extinktion bei 595 nm gegen das Farbreagens am UV-Spektralphotometer gemessen. Die Eichkurve läßt sich mit je 0,1 ml verschiedener Konzentrationen (von 16,5-165 μ g) des Protein-Standards (Fa. BioRad, Protein Assay Kit, Rindergammaglobulin : 1,65 mg/ml) ermitteln.

Farbreagens:

Die gelieferte, konzentrierte Farblösung (Fa. BioRad) muß mit bidest. Wasser im Verhältnis 1:4 (v/v) verdünnt und danach über Whatman No 1 abfiltriert werden. Das verdünnte Farbreagens hält sich bei Raumtemperatur 2 Wochen.

d. TCA-Trübungstest:

Die proteinhaltigen Proben werden in Plastikkuvetten (1/1/4,5 cm) mit dest. Wasser auf 1 ml aufgefüllt, 1,5 ml 10 %ige TCA zugegeben und gut umgeschüttelt. Nach genau 30 sec. nach Zugabe der TCA wird am UV-Spektralphotometer bei 450 nm die Trübung, hervorgerufen durch ausgefälltes Protein, gegen den Nullwert (= 1 ml dest. Wasser + 1,5 ml 10 %ige TCA) gemessen. Die Eichkurve läßt sich mit Rinderserumalbumin (10 mg/10 ml dest. Wasser) im Bereich von 0,1-1,0 mg Protein aufstellen.

Handelt es sich um gefärbte Proteinlösungen, so empfiehlt es sich, nach der Trübungsmessung die mit TCA gefällten Proteine abzuzentrifugieren (30 min. bei 40000 UpM in UZ) und die Extinktion des klaren Überstandes bei 450 nm zu messen. Durch Subtraktion der beiden Extinktionswerte (Trübungsmessung - Messung der klaren Lösung) erhält man dann den korrigierten Wert, der dem Proteingehalt der Probe entspricht.

13.2. Gel-Elektrophoresen

13.2.1. Disc-Gelelektrophorese pH = 8,8 (MAURER, 1971)

Lösungen für die Elektrophorese:

A. Gelpuffer:

36,6 g Tris + 0,23 ml TEMED + 100 ml H₂O dest. mit HCl konz. auf pH = 8,8 einstellen

B. Acrylamidlösung:

30 g Acrylamid (Fa. Serva) + 0,8 g Bisacrylamid (Fa. Serva) + 100 ml H₂O dest.

C. Katalysatorlösung (immer frisch ansetzen!):

150 mg Ammoniumperoxidisulfat (Fa. Merck) + 100 ml H₂O dest.

D. Kammerpuffer (= Elektrodenpuffer):

6 g Tris + 28,8 g Glycin + 3,7 g EDTA in 1 l H₂O dest. lösen (bei Verwendung 1:10 verdünnen)

Alle Lösungen müssen bei Gebrauch Zimmertemperatur haben!

7,7 %iges Acrylamidgel = A:B:H₂O dest.:C = 1:2:1:4

7,0 %iges Acrylamidgel = A:B:H₂O dest.:C = 1:1,82:1,18:4

a. analytische Disc-Gelelektrophorese:

Die Proteinauftrennung der zu untersuchenden Proben mittels Disc-Elektrophorese erfolgte auf 7,7 %igen Acrylamidgelen in Glasröhrchen (0,6/10 cm) bei pH = 8,8 und 4°C in einer analytischen Elektrophoreseapparatur (Fa. Shandon) mit einem Fassungsvermögen von 8 Gelröhrchen. An jedes Gel wurde mit Hilfe eines Netzgerätes (Fa. Shandon, SAE 2761) eine konstante Stromstärke angelegt.

Nach dem Polymerisieren der Gellösung in den Glasröhrchen war ein Vorlauf zur Entfernung des überschüssigen Katalysators von 30 min. bei 3,5-4 mA pro Gel nötig. Danach wurden von den in 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0 gelösten und mit Glycerin beschwerten Proben 25 bis maximal 100 μ l Lösung auf die Gele aufgetragen. Zur Markierung der Front dienten ein paar Tropfen einer 0,05 %igen wäßrigen Bromphenolblaulösung, die dem oberen Kammerpuffer zugesetzt wurden. Bei einer Stromstärke von 3 mA pro Gel dauerte ein Lauf 3-4 Std. Nach dem Herauslösen der Gele aus den Glasröhrchen mit einer Injektionsnadel wurden sie zur Anfärbung in die jeweiligen Färbelösungen gelegt. Die überschüssige Farbe mußte anschließend wieder aus den Gelen mit Entfärber entfernt werden, da nur angefärbte Gelbanden auf farblosem Untergrund am Densitometer ausgemessen werden können.

1. Proteinanfärbung mit Coomassie-Blau (über Nacht):

Färbelösung: Coomassie-Blau G 200 (0,05 %) gelöst in einer Mischung aus Eisessig:Methanol:H₂O dest. = 1:5:5
Entfärber : 75 ml Eisessig + 50 ml Äthanol + 875 ml H₂O dest.
(CHRAMBACH et al., 1967)

2. Glykoproteinanfärbung:

Sowohl bei der Anfärbung der Glykoproteine mit Alcianblau (a.) als auch mit fuchsinschwefeliger Säure (b.) entsprechen sich die einzelnen Schritte der Gelbehandlung von 1 bis 4, während ab dem 5. Färbeschritt unterschiedlich verfahren wird.

a. mit Alcianblau (WARDI u. MICHOS, 1972):

1. Gele in 12,5 %ige TCA (25-50 ml/Gel) für 30 min. (oder über Nacht) legen
2. Gele mit H₂O dest. spülen (Vorsicht, Proteine können möglicherweise wieder in Lösung gehen!)
3. Gele 50 min. eintauchen in 1 %ige Perjodsäure (frisch ansetzen in 3 %iger Essigsäure)
4. Überschüssiges Perjodat wird 6 mal je 10 min. mit H₂O dest. ausgewaschen. Beim letzten Waschen mit 0,1 N AgNO₃-Lösung auf Perjodat testen; wenn Test mit Waschwasser negativ,

noch 2 mal mit H_2O dest. waschen

5. Gele 40 min. in 0,5 %iges Natriummetabisulfit ($Na_2S_2O_5$ in H_2O dest.) legen; dabei 3 mal Lösung wechseln, bis Gel nur noch in den Proteinbanden gelb gefärbt ist
6. Gele 4 Std. in 0,5 %iger Alcianblaulösung in 3 % Essigsäure anfärben
7. Entfärben in 7 % Essigsäure

b. mit fuchsinschwefeliger Säure (ZACCHARIUS u. ZELL, 1969):

1. - 4. siehe unter a.

5. Gele 50 min. mit Schiff's Reagenz (PAS) im Dunkeln versetzen
6. Gele waschen mit frisch bereitetem 0,5 % Na-disulfit (25-50 ml/Gel) 3 mal je 10 min.
7. Gele waschen mit H_2O dest. unter Rühren und häufigem Wechsel bis überschüssige Farbe entfernt ist
8. Gele aufheben in 3-7,5 % Essigsäure

PAS-Reagenz (McGUCKIN u. McKENZIE, 1958):

4,5 g Fuchsin in 1,5 l H_2O dest. lösen, danach erst 9,6 g K-disulfit zufügen, dann 40 ml 6 N H_2SO_4 . Gründlich mischen und die Lösung eine Nacht bei $4^\circ C$ stehen lassen (dunkel!). Anschließend wird die Lösung mit 3 g Aktivkohle entfärbt. Nach Filtration über einen Porzellanfilter erhält man ein strohfarbenedes Reagenz (sehr toxisch!). Da dieses Reagenz photosensitiv ist, muß es im Dunkeln bei $4^\circ C$ aufbewahrt werden. PAS-positive Banden sind pinkfarben.

b. präparative Disc-Elektrophorese:

Zur Durchführung einer präparativen Gelelektrophorese pH = 8,8 mit 7,0 %igem Acrylamid bei $4^\circ C$ wurde eine kühlbare Elektrofocussiersäule (Fa.LKB) verwendet. Dabei befand sich die Kathode am oberen und die Anode am unteren Ende der Säule. Zur Stabilisierung des Systems wurde ein Dichtegradient aus Saccharose zwischen die beiden ringförmigen Acrylamidgele geschichtet. Als unterer Verschuß der Säule diente ein Stück Dialysemembran, auf die das 7,0 %ige Acrylamidgel 2 cm hoch eingefüllt wurde. Der sich anschließende Zuckergradient betrug

60-15 % (je 50 ml Lösung). Darüber polymerisierte das obere Gel (= 3 cm), das anschließend mit Elektrodenpuffer (1:10 = v:v) bis zum Elektrodenansatz überschichtet wurde. Das untere Gel tauchte in den gekühlten Elektrodenpuffer, worin auch die Elektrode (= Platindraht) hing.

Probenauftrag: 2 ml gelöste Probe (in 20 mM Tris pH = 7,5/ 5 mM DTT), beschwert mit Saccharose und zur Markierung mit Bromphenolblau versetzt, wurden auf das obere Gel geschichtet.

Lauf : Anfang 3 mA (Δ 80 V), nach 30 min. 15 mA

Laufende : Bromphenolblaubande war aus dem Gel heraus und durch Gradient 9 cm weit gewandert.

Isolieren der Banden: Durch das untere Gel wurde über eine Injektionsnadel der Saccharosegradient mit den Proteinbanden abgepumpt. Die Extinktion der ausfließenden Lösung wurde in einer Durchflußküvette bei 254 nm gemessen und nach diesem Elutionsdiagramm die einzelnen Fraktionen (= Proteinbanden) geschnitten, die dann mit der GC-Methode auf IES untersucht wurden.

13.2.2. Isoelektrische Focussierung pH = 2-11 (WRIGHLEY, 1968)

Lösungen für die Focussierung:

A. Acrylamidlösung (siehe 13.2.1.B)

B. Katalysatorlösung:

14 mg Riboflavin + 1 ml TEMED + 100 ml H₂O dest.

C. Trägerampholyt:

Servalyt 40 % (Fa. Serva), pH-Bereich 2-11

D. Kathodenpuffer (untere Kammer):

0,4 % Äthanolaminlösung (Äthanolamin, Fa. Merck, wurde bei 15 Torr und 73-75°C im Ölbad destilliert)

E. Anodenpuffer (obere Kammer):

0,25 % Schwefelsäure

7,6 % Focussiergel = A + H₂O dest. + B + C = 6 + 16,4 + 1,2 +
0,6 ml

Die Bestimmung der isoelektrischen Punkte wurde mit der unter 13.2.1.a. beschriebenen Disc-Elektrophoreseapparatur bei 4°C mit den entsprechenden Gelröhrchen durchgeführt, in denen die eingefüllte 7,6 %ige Focussiergellösung mittels UV-Licht innerhalb von 1-2 Std. polymerisierte. Im Gegensatz zur Disc-Elektrophorese wurden aber bei der Focussierung die Pole vertauscht. Zum Auftragen wurden die Proben in 40 %iger Saccharoselösung gelöst und maximal 0,1 ml auf die Geloberfläche geschichtet. Zur Ermittlung der Eichkurve mußten bei jedem Lauf ein oder zwei Röhrchen mit Proteintestmischung 8 (Fa. Serva) beschickt werden. Darauf kam eine Schutzlösung, bestehend aus 20 %iger Saccharoselösung mit 1 % Ampholyt, pH = 2-11. Die Focussierung wurde mit konstanter Voltzahl (= 100 V) begonnen und nach einer Stunde auf 280 V erhöht. Nach insgesamt ca. 2 Std. war der Lauf beendet. Danach wurden die herausgelösten Gele sofort zur Proteinfixierung in 20 % TCA gelegt.

Zur pH-Bestimmung der aufgetrennten Proteinbanden werden die jeweiligen Laufstrecken der Eichproteine im Gel ausgemessen und gegen ihren pH-Wert auf Millimeterpapier aufgetragen. Aus dieser Eichkurve kann dann anhand der Laufstrecken der focussierten Proben direkt der IEP der einzelnen Proteinbanden abgelesen werden.

13.2.3. SDS-Elektrophorese (in Anlehnung an SHAPIRO et al., 1967; WEBER u. OSBORNE, 1969)

Lösungen für die SDS-Elektrophorese:

A. Stamppuffer:

0,5 M Na-Phosphatpuffer pH = 7,2

B. Elektrophoresepuffer:

1 g SDS + 200 ml Lösung A mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen

C. Probenpuffer:

0,2 g SDS (Fa. Suchard-Merck) + 2 ml Lösung A + 10 ml Glycerin (bidest.)

D. Acrylamidlösung:

30 g Acrylamid + 0,8 g Methylen-bis-acrylamid + 0,1 g SDS

E. 1,6 ml Dimethylaminopropionitril + 0,1 g SDS

F. 30 mg $K_3[Fe(CN)_6]$ + 100 mg SDS

G. 0,6 g Ammoniumperoxodisulfat + 0,1 g SDS (frisch ansetzen!)

Zu den Lösungen D, E, F und G werden jeweils 20 ml Stamppuffer zugefügt und danach die Lösungen mit H_2O dest. auf 100 ml aufgefüllt.

7,5 %iges Acrylamidgel = D : E : F : G = 1 : 1 : 1 : 1

Die Bestimmung der Molekulargewichte wurde mit der unter 13.2.1.a. beschriebenen Disc-Elektrophoreseapparatur bei Raumtemperatur (Fönkühlung) und Glasröhrchen (0,5/7,5 cm) durchgeführt, in denen die eingefüllte 7,5 %ige Acrylamidlösung (0,1 %ig an SDS) innerhalb einer Stunde völlig polymerisierte. Zur Entfernung des überschüssigen Katalysators mußte auch hier ein Vorlauf von 30 min. mit 6-7 mA/Gel durchgeführt werden.

Zur Probenvorbereitung wurden entweder zusammen oder einzeln je 10 μ l der Eichproteinlösungen (Fa. Boehringer, Reagentienkollektion Combithek, MG 3000-22000) oder die entsprechenden Mikroliter der zu untersuchenden Probe mit Probenpuffer (insgesamt max. 100 μ l Lösung) versetzt und 3 min. bei 90°C erhitzt. Danach wurden je 5 μ l Bromphenolblaulösung 0,1 % zugegeben. Die so vorbereiteten Proben konnten auf die Gele aufgetragen und mit 50 mA ($\hat{=}$ ca. 6 mA/Gel) elektrophoretisch getrennt werden. Die Laufzeit betrug 3-3 1/2 Std.

Die mittels einer Injektionsnadel herausgelösten Gele werden nach dem Ausmessen der Gesamtlänge und der Wanderstrecke der Bromphenolblaubande wie unter 13.2.1.a. über Nacht mit Coomassieblau (G 200) angefärbt und anschließend entfärbt. Innerhalb der nächsten 4 Tage wechselt man die Entfärberlösung täglich aus. Danach werden die Gesamtlängen der Gele und Wanderstrecken der jetzt sichtbar gewordenen Proteinbanden gemessen. Die Division der Wanderstrecke des Proteins durch die der Bromphenolblaubande ergibt die Mobilität, wobei die Gellänge vor und nach Anfärben bzw. Entfärben berücksichtigt wird.

Anschließend trägt man auf halblogarithmisches Papier den log der MG der Eichproteine gegen die errechnete Mobilität auf und erhält so die Eichgerade, aus der sich dann anhand der Mobilitäten der Probe direkt das MG ihrer Proteinbanden bestimmen läßt.

13.3. Aminosäuren-Analyse

Die entsalzten IES-haltigen Proteinfractionen wurden nach saurer Hydrolyse (16 Std. bei 100°C mit 4 N HCl) einer Aminosäuren-Analyse unterzogen.

Gerät	: Beckman-Analyzer 120 C
Säulenfüllmaterial	: Beckman-Harz M 72
Puffer A	: 0,2 N Citratpuffer pH = 3,24
Puffer B	: 0,7 N Citratpuffer pH = 4,22
Auftragspuffer	: 0,2 N Citratpuffer pH = 2,2
Temperatur	: 30-55°C
Aminosäurenlauf	: 360 min.

Die quantitative Bestimmung der AS erfolgte photometrisch nach Versetzen mit Ninhydrin-Reagenz gegen bekannte AS genau definierter Mengen. Zur Auswertung wurden die Molverhältnisse anhand der AS-Peaks auf dem Chromatogramm errechnet (Tab. 21).

13.4. Papierchromatographie der Zucker

a. saure Hydrolyse:

Die auf Zucker zu testenden lyophilisierten Fraktionen mußten zur vollständigen Hydrolyse in 1 N HCl gelöst und 2 Std. bei 100°C im Fiolaxröhrchen erhitzt werden. Anschließend wurde die Säure nach Zugabe von Methanol ohne Erwärmung abgeblasen. Anstelle von HCl wurde auch 3 N H₂SO₄ verwendet. Nach der Hydrolyse (100°C/4 Std.) ließ sich die H₂SO₄ mit BaCO₃ neutralisieren, das ausgefallene BaSO₄ abzentrifugieren und der Überstand einengen.

b. enzymatische Hydrolyse mit β -Amylase:

Um zu testen, ob die zuckerhaltige Fraktion wasserlösliche Stärke oder Dextrine enthält, wurde eine enzymatische Amylase-Spaltung durchgeführt, wobei vorhandene Stärke oder Dextrine bis zu Maltose abgebaut werden. Dazu mußte die zu spaltende

Fraktion in 100 μ l Puffer gelöst und nach Zugabe von 20 μ l Enzym bei 32°C 5 Std. inkubiert werden.

Enzym: Amyloglucosidase (Fa. Boehringer) in 0,1 M Na-Acetat-puffer pH = 4,6

Nach den Hydrolysen folgte jeweils eine absteigende Papierchromatographie der Zucker bei 25°C auf Whatmanpapier Nr. 1 (aufgetragene Menge 10-50 μ l).

Fließmittel für eindimensionale Chromatographie:

Äthylacetat/Pyridin/H₂O dest. = 4 : 3 : 1

Fließmittel für zweidimensionale Chromatographie:

1. Richtung:

88 % Phenol/Eisessig/EDTA/H₂O dest. = 840:10:1:160

2. Richtung:

Lösung 1: Lösung 2 = 1 : 1

Lösung 1: n-Butanol/H₂O dest. = 750:50

Lösung 2: Propionsäure/H₂O dest. = 352:448

Sprühreagenz für Zucker auf PC:

alkalisches AgNO₃ (TREVELYAN et al., 1950):

Die entwickelten Papierchromatogramme taucht man in eine Lösung aus 1 l Aceton + 10 ml gesättigte, wäßrige AgNO₃-Lösung und besprüht anschließend mit einer Lösung aus 800 ml Äthanol + 30 ml gesättigte NaOH.

13.5. Zuckerbestimmung

Mit Hilfe der Anthron-Reaktion (SPIRO, 1966) konnte sowohl der Zuckergehalt der ersten P-2 Fraktion ermittelt als auch die Säuleneluat auf Zucker getestet werden.

a. Zuckerbestimmung der ersten P-2 Fraktion:

Zur Zuckerbestimmung der ersten P-2 Fraktion wurde nach saurer Hydrolyse von 4 mg Probe in 600 μ l 3 N H₂SO₄ (wie unter 13.4.a.) der Glucosegehalt nach Anthron-Reaktion (siehe b.) mittels colorimetrischer Messung bei E = 623 nm bestimmt. Ebenfalls dieser Bestimmung wurden 5 mg Ovomuroid (Fa. Serva), dessen Kohlenhydratanteil bekannt ist, nach saurer Hydrolyse unterzogen, um durch Vergleich mit dem tatsächlichen Zuckeranteil und dem ermittelten Glucosegehalt den prozentualen

Kohlenhydratanteil der ersten P-2 Fraktion bestimmen zu können.

Eichkurve: Glucoselösung im Bereich von 25-200 μg Glucose

Ovomucoid	erste P-2 Fraktion
100 μl = 55 μg Glucose	100 μl = 110 μg Glucose
600 μl = 330 μg Glucose	600 μl = 660 μg Glucose
Glucoseanteil = 6,6 %	Glucoseanteil = 16,5 %
tatsächlicher } = 21 %	korrigierter } = 52,5 %
Zuckeranteil }	Zuckergehalt }

b. Zuckernachweis bei Säuleneluaten:

Mit Hilfe der Anthron-Reaktion lassen sich auch Säuleneluat auf Zucker untersuchen. Dazu wurden sofort nach beendetem Säulenlauf von den Fraktionen je 0,4 ml abgenommen und mit je 4 ml Anthron-Reagenz im Eisbad gemischt, gut umgeschüttelt und dann 8 min. bei 100°C im Wasserbad kochen gelassen. Nach dem Abkühlen der Lösungen mißt man die Extinktion bei 623 nm gegen den Nullwert.

Anthron-Reagenz:

Zu 550 ml 70 %iger H_2SO_4 werden bei 30-40°C 110 mg Anthron zugegeben. Das Anthron-Reagenz muß kühl und dunkel aufbewahrt werden.

13.6. Kartierung von Zuckerpeptiden nach Trypsin-Abbau

a. tryptischer Abbau der ersten P-2 Fraktion:

2,5 mg der ersten P-2 Fraktion wurden in 0,3 ml 0,1 M Ammoniumbicarbonat-Lösung pH = 8,5 mit 1 % Gewichtsanteil an TPCK-Trypsin (Fa. Merck) versetzt, das spezifisch hinter Lysin und Arginin spaltet. TPCK hemmt die proteolytische Aktivität des in der Trypsinpräparation als Kontamination vorhandenen Chymotrypsins. Nach 2 Std. Inkubation bei 37°C wurde nochmals die gleiche Menge an TPCK-Trypsin zugegeben. Weitere 2 Std. später ließ sich die Spaltung durch Einfrieren des Ansatzes und sofortige Lyophilisation abbrechen.

b. zweidimensionale Chromatographie der Peptide:

Die lyophilisierten tryptischen Peptide wurden in 20-30 μ l einer 1:3 Verdünnung des Elektrophorese-Puffers (2 M Essigsäure; 0,6 M Ameisensäure; pH = 1,9) gelöst und auf eine mit Elektrophorese-Puffer befeuchtete Kieselgelplatte (Fa. Merck, "DC-60" ohne F, 20/20 cm) aufgetragen.

Die Trennung in der 1. Dimension erfolgte durch 60 min. Elektrophorese unter Anlegen von 1000 Volt/20 cm bei 5°C. Die Platte wurde anschließend gründlich abgetrocknet und in einem Pyridin/Eisessig/n-Butanol/Wasser-Gemisch (v:v:v:v = 40:68:14:25) 15 Std. senkrecht zur Richtung der Elektrophorese chromatographiert. Nach dem Trocknen der Platte wurden die Peptide mit Ninhydrin (EASELEY, 1965) und die Zucker mit alkalischem Silbernitrat (TREVELYAN et al., 1950, siehe 13.4.) sichtbar gemacht.

13.7. Bindungsversuche mit Concanavalin A

a. Extinktionsmessung der Trübung (DOYLE u. CRONHOLM, 1969):

Sowohl die erste P-2 Fraktion als auch die salzfreie erste und zweite P-10 Fraktion wurde immer im selben Lösungsmittel (z.B. dest. Wasser, Puffer) wie auch das Con A (Fa. Pharmacia) gelöst, miteinander versetzt und anschließend die Extinktion bei 600 nm gegen den Nullwert (= reine Con A Lösung) nach verschiedenen Reaktionszeiten gemessen, wobei die Lösung von jeder Trübungsmessung gut umgeschüttelt wurde.

b. Ausfällen der unlöslichen Zucker-Con A-Komplexe:

Sollte die IES-haltige Lösung nach Fällung mit Con A (2 mal je 1 Std. oder 2 mal je 30 min. bei 4°C) weiter untersucht werden, so mußten die unlöslichen Zucker-Con A-Komplexe 30 min. bei 40000 UpM in der UZ bei 2°C abzentrifugiert werden. Der klare Überstand wurde entweder sofort einer IES-Bestimmung unterworfen oder lyophilisiert und danach weiter aufgetrennt.

13.8. Phosphatbestimmung

Diese Methode, die von FISKE u. SUBBAROW (1925) entwickelt und von FLYNN et al. (1954) modifiziert und verfeinert wurde, erfaßt anorganisches Orthophosphat.

Zur Phosphatbestimmung der ersten P-2 Fraktion wurden 0,8 mg Probe in 2 ml dest. Wasser gelöst und 100, 200 und 400 μ l zur Bestimmung eingesetzt. Die jeweilige Lösung, die ca. 0,05-0,5 μ Mol HPO_4^{2-} enthalten soll, wurde mit 250 μ l Molybdat-Reagenz (2,1 g Ammoniummolybdat in 33 ml H_2O dest. + 42 ml 10 N H_2SO_4) und 100 μ l Eikonogen-Lösung (Fiske-Subbarow-Reagenz: 1-Amino-2-Naphtyl 4-Sulfonsäure + Natriumsulfit und -bisulfit, Fa. Sigma) versetzt und auf 2,5 ml aufgefüllt. Die Extinktion wird genau 10 min. nach Zugabe der Eikonogen-Lösung im UV-Spektralphotometer bei 691 nm gemessen.

Eichkurve: 10^{-3} M KH_2PO_4 -Lösung, Bereich: 0,05-0,5 μ M.

13.9. Bindungsversuche mit Aktivkohle

a. Kohlefilter:

Dieser Bindungsversuch wurde zunächst mit der entsalzten zweiten P-10 Fraktion ($\hat{=}$ ca. 4 g Karyopsen) durchgeführt, wobei 2 mal je 0,25 ml Lösung, verdünnt mit 0,25 ml bidest. Wasser, auf den Kohlefilter ($\varnothing$ 11,0 cm) aufgetragen wurden. Die Feuchtigkeit ließ sich mit einem kalten Fön abblasen. Anschließend mußte der Filter auf einer Nutsche langsam 2 mal mit je 100 ml bidest. Wasser, danach mit 100 ml 50 %igem Äthanol gewaschen werden. Die beiden vereinigten Wasserfraktionen wurden sofort lyophilisiert, während das Äthanol der Alkoholfraktion erst am Rotationsverdampfer bei 35°C abgezogen werden mußte.

b. Kohle-Celite-Säule (modifiziert nach WHISTLER u. DURSO, 1950):

10 g Aktivkohle (Fa. Serva) und 15 g Celite (Fa. Serva, Kieselsgur 20-45 μ) wurden mit dest. Wasser dünnflüssig angerührt und anschließend im Exikator 30 min. entgast. Nach Füllen der Säule (1,5/20 cm) mit dieser Mischung mußte die Säule zunächst 1 Std. mit dest. Wasser äquilibriert werden. Danach konnte die

Hälfte des Säuleneluats der zweiten P-10 Fraktion sofort nach beendeter Gelfiltration (ca. 100 ml) auf die Kohlesäule mit 35 ml/h aufgepumpt werden. Nach beendetem Probenauftrag wurde die Säule zur Elution der Salze mit dest. Wasser solange gespült, bis kein Phosphat im Eluat mehr nachweisbar war. Danach wurde zunächst ein linearer Äthanolgradient (0-50 %) an die Säule angeschlossen (je 30 ml) und nach Beendigung erst mit 50 % und dann mit 80 %igem Äthanol eluiert. Die 0-50 % und 50 %ige Äthanolfraktion wurden vereinigt und ebenso wie bei der 80 %igen Alkoholfraktion das Äthanol am Rotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wurden alle wäßrigen Eluate lyophyllisiert.

III. E R G E B N I S S E

1. Nachweis der aus Haferkaryopsen isolierten IES mittels verschiedener Methoden

Viele verschiedene Methoden zur IES-Bestimmung sind mittlerweile schon beschrieben worden, wobei die Angaben über den Gehalt an IES in Pflanzenextrakten entweder durch einen Biotest (vgl. LARSEN, 1961; WHEELER, 1972) oder durch chemische Reaktionen erhalten werden. UEDA und BANDURSKI (1969) verwendeten dazu die ziemlich unspezifische Farbreaktion mit Salkowski-Reagenz. ZIMMERMANN und RÜDIGER (1976) hingegen bevorzugten den Nachweis auf DC, wobei die IES mit van Urk-Reagenz sichtbar gemacht wird. Zur Erfassung kleiner Mengen an IES arbeiteten BANDURSKI und SCHULZE (1974) die Isotopen-Verdünnungsmethode mit radioaktiv markierter IES aus. Auch mit der von STOESSL und VENIS (1970) vorgeschlagenen relativ aufwendigen Fluoreszenzmessung des aus IES gebildeten Indol- α -pyrons, ebenso wie mit der GC-MS Bestimmung der silylierten IES von PRZYBYLLOK und NAGL (1977) soll es möglich sein, bei der IES-Bestimmung im Mikromaßstab arbeiten zu können.

Zunächst wurden nach Freisetzung und Isolierung der IES aus Hafer verschiedene Verfahren zur IES-Bestimmung getestet, um durch Vergleich einerseits die erhaltenen Ergebnisse abzusichern und andererseits für die weiteren IES-Bestimmungen die einfachste, schnellste und zugleich sicherste Methode zu finden.

1.1. DC nach saurer Ätherextraktion

Um die IES-Gesamtmenge der verwendeten Hafersorte (Husar, Ernte 1974) als auch die Menge an freier und gebundener IES bestimmen zu können, wurde zunächst auf das von ZIMMERMANN und RÜDIGER (1976) beschriebene Verfahren zurückgegriffen. Dabei wurde die freie IES durch heiße Methanolextraktion gewonnen, die gebundene IES ließ sich aus dem hydrolysierten Rückstand des Methanolansatzes nachweisen und die Gesamtmenge an IES wurde durch Hydrolyse freigesetzt. Danach folgt jeweils saure Ätherextraktion und DC.

1.1.1. Bestimmung der IES-Gesamtmenge sowie der Menge an freier und gebundener IES

Aus 1,0 g feingemahlener Haferkörner (= bespelzte Karyopsen) wurde nach 48-stündiger Hydrolyse in einem Liter 1 N NaOH mittels DC-Platten, die nach Farbreaktion mit van Urk am Densitometer bei 583 nm ausgemessen wurden, eine IES-Gesamtmenge von $2,58 \pm 0,21$ mg/100 g Körner ermittelt. Da die Menge der Begleit-substanzen auf den Chromatogrammen durch Abtrennen der Spelzen von den Karyopsen wesentlich verringert werden konnte und sich damit die IES-Bestimmungen sauberer und genauer durchführen ließen, wurden nur mehr entspelzte Körner (= Karyopsen) aufgearbeitet. In den Spelzen konnte aber ebenfalls sowohl freie als auch gebundene IES nachgewiesen werden. Als sehr wichtig erwies sich übrigens, nur frisch entspelzte Körner zu verwenden, da länger gelagerte Karyopsen eine wesentlich geringere IES-Ausbeute lieferten. Ebenfalls ein IES-Verlust trat nach der Methanolextraktion beim Trocknen des Rückstandes auf, woraus die gebundene Form der IES isoliert und bestimmt wurde (Tab. 1).

Tab. 1: Gehalt an gebundener IES (Fehlergrenze $\pm 8\%$) nach verschiedenen langen Trocknungszeiten des mit Methanol extrahierten Rückstandes aus Haferkaryopsen (75 g $\hat{=}$ 100 g Körnern)

Frischgew. (g) d. Karyopsen ($\hat{=}$ 30g Körner)	Trockengew. (g) des Methanol- rückstandes	Trocknungs- dauer. (Tage)	Aliquot zur IES-Best. (g) ($\hat{=}$ 2g Körn.)	Menge an geb. IES (mg/100g K.)
22,5	21,9	0,5	1,46	$1,306 \pm 0,104$
22,5	20,7	6,0	1,38	$1,078 \pm 0,086$
22,5	20,1	8,0	1,34	$1,040 \pm 0,083$

Dieser Verlust an gebundener IES beim Trocknen konnte aber verhindert werden, indem freie und gebundene IES nicht mehr aus dem selben Ausgangsmaterial bestimmt wurden, sondern in einer Probe mit 22,5 g Karyopsen ($\hat{=}$ 30 g Körnern) nur die freie IES ermittelt, während in einer Parallelprobe mit 1,5 g Karyopsen ($\hat{=}$ 2 g Körnern) sofort aus dem gesamten Rückstand der Methanolextraktion die gebundene IES freigesetzt wurde. Die Gesamtmenge an IES wurde eben-

falls aus 1,5 g Karyopsen ermittelt. So konnten mit dieser Methode experimentell wie rechnerisch identische Werte erzielt werden (Tab. 2).

Tab. 2: Gehalt an freier und gebundener IES, wie Gesamtmenge an IES in Haferkaryopsen (75 g $\hat{=}$ 100 g Körnern), Fehlergrenze + 8 %.

	mg/100 g Körner		
	freie IES	gebundene IES	gesamte IES
Mittelwert aus 3 Be- stimmungen	0,057 <u>±</u> 0,005	1,463 <u>±</u> 0,117	1,526 <u>±</u> 0,122

1.1.2. Prüfung des Einflusses von p-Cumarsäure und 3-Indolyl-Brenztraubensäure auf die IES-Bestimmung

Da BANDURSKI und SCHULZE (1974) bei ihren Untersuchungen mit p-Cumarsäure gleiche chromatographische Eigenschaften wie die der IES feststellten, mußte getestet werden, ob die über DC ermittelten IES-Mengen durch vorhandene p-Cumarsäure möglicherweise verfälscht werden. Dazu wurden IES und p-Cumarsäure gemeinsam unter den gleichen Bedingungen chromatographiert wie bei einer IES-Bestimmung. Mit van Urk ergab p-Cumarsäure auf DC (Laufstrecke: 1 x 10 cm), die im getesteten Fließmittel einen R_f -Wert von 0,18 gegenüber 0,2 der IES aufwies, nur eine schwache lila Färbung im Gegensatz zur IES mit einer blauen Farbreaktion. Am Densitometer wurden sowohl die Flecken der p-Cumarsäure allein (lila) als auch die der IES (blau) sowie die beider zusammen bei derselben Wellenlänge = 583 nm ausgemessen. Um den blauen Fleck der IES alleine vermessen zu können, mußte dazu das Densitometer auf den lila Fleck der p-Cumarsäure auf Null eingestellt werden (Tab. 3).

Tab. 3: Densitometrische Ausmessung der IES-Flecken in Gegenwart von p-Cumarsäure auf einer DC-Platte nach Sichtbarmachung mit van Urk-Reagenz

	Peak-Flächen der Flecke (cm ²)		
	lila	blau	lila + blau
100 µg p-Cumarsäure	2,08		
100 µg p-Cumarsäure+1 µg IES		1,92	3,92
100 µg p-Cumarsäure+2 µg IES		3,75	5,67
1 µg IES		2,00	
2 µg IES		3,83	

Wie man aus den Werten der Tab. 3 ersieht, konnten selbst bei einem 100-fachen Überschuß an p-Cumarsäure gegenüber IES die beiden Substanzen anhand der blauen Farbreaktion der IES auf der Platte getrennt ausgemessen werden mit einer Fehlergrenze von ± 2 %. Eine Verfälschung der densitometrisch über DC ermittelten IES-Mengen durch vorhandene p-Cumarsäure konnte daher mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Ebenso mußte die von ATSUMI et al. (1976) aufgrund ihrer Untersuchungen aufgestellte Behauptung geprüft werden, daß bei jeder IES-Bestimmung durch Ätherextraktion unter Verwendung basischer Lösungsmittel immer auch IES gefunden wird, die erst während der Aufarbeitung des Pflanzenmaterials aus 3-Indolyl-Brenztraubensäure durch spontane Oxidation entsteht. Nach BENTLEY et al. (1956) beträgt aber diese "IES-Ausbeute" nach Papierchromatographie von Indolyl-Pyruvat im basischen Fließmittel maximal nur 10 %. Deshalb wurde zunächst über DC anhand eines Vergleichslaufes von authentischer IES und Indolyl-Brenztraubensäure, die beide im verwendeten Fließmittel gleiche R_f -Werte besitzen, die Menge Indolyl-Brenztraubensäure pro Fleck ermittelt, die eine gut sichtbare positive van Urk-Reaktion liefert. Nachdem so eine Menge von 12 µg bestimmt worden war, wurden für den Hydrolyseversuch 0,1 mg Indolyl-Brenztraubensäure als ausreichend errechnet, da selbst bei 50 %igem Arbeitsverlust (KNEGT u. BRUINSMA, 1973) und Verteilung der Menge auf dem Chromatogramm auf 4 Flecke immer noch 12,5 µg pro Fleck treffen; d.h. bei Entstehung von 10 % IES (BENTLEY et al. 1956) sollte pro Fleck ca. 1 µg IES vorliegen. Diese Menge ist anhand der Farbreaktion mit van Urk noch sehr gut sichtbar (Nachweisgrenze: 60 ng ; KALDEWEY, 1967). So

wurden 0,1 mg authentische 3-Indolyl-Brenztraubensäure unter den gleichen Bedingungen, die bei den IES-Bestimmungen aus den Haferkaryopsen vorlagen, hydrolysiert und chromatographiert. Da aber nach Besprühen mit van Urk keine Farbreaktion im erwarteten Bereich auf der Platte sichtbar wurde außer der der IES-Kontroll-Flecke, war hiermit nachgewiesen, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen der durch Decarboxylierung des Pyruvats eventuell gebildete Indolacetaldehyd nicht zur IES oxydiert wird. Damit konnte eine Verfälschung der über DC ermittelten IES-Mengen ausgeschlossen werden.

1.2. Biotest nach Reinigung über DC

Da viele Autoren u.a. THIMANN (1934), v. GUTTENBERG u. LEHLE-JOERGES (1947), LARSEN (1961) und WHEELER (1972) den Biotest zur Bestimmung der IES von Getreidekörnern entweder allein oder neben anderen Methoden verwendeten, wurde ebenfalls versucht, die durch rein chemische Methoden gewonnenen Ergebnisse der IES-Bestimmung von Haferkaryopsen mit Hilfe des Biotests zu überprüfen und abzusichern. Am geeignetsten dafür schien der Weizenkoleoptilzylindertest zu sein, der sich einmal durch große Empfindlichkeit gegenüber IES auszeichnet und zum anderen ohne größeren Aufwand durchführen läßt.

1.2.1. Nachweis der Bioaktivität nach DC mit authentischer IES

Da SAGI (1969) beim Trocknen der DC-Platten nur geringe IES-Verluste feststellte, KALDEWEY u. STAHL (1964) aber nach DC in einem sauren Fließmittel maximal nur 5 % der Bioaktivität der eingesetzten IES wiederfanden, mußte zunächst einmal der prozentuale Verlust der biologischen Aktivität von authentischer IES getestet werden, die nach der für die Auftrennung der IES-Extrakte üblichen DC von der Platte eluiert wurde.

Dazu wurden 3,5 mg IES in Aceton gelöst und bandförmig auf eine gepufferte Kieselgelplatte aufgetragen. Um auf der Platte nach deren Entwicklung die Laufhöhe der IES erkennen zu können, wurde als Indikator ein IES-Eichfleck mitchromatographiert und dieser mit van Urk angefärbt. Anhand dieser Markierung konnte dann die IES mit dest. Wasser von der Platte eluiert und das Eluat auf eine $10^{-3}M$ Lösung (3,5 mg IES/20 ml) eingestellt werden. Für den

Biotest wurde diese $10^{-3}M$ Ausgangslösung mit dest. Wasser auf 10^{-5} und $10^{-7}M$ IES verdünnt. Der Vergleich zwischen der IES-Eichkurve von $10^{-3}M$ bis $10^{-7}M$ und den Werten, die die nach DC eluierte authentische IES lieferte, ergab nach statistischer Absicherung keinen signifikanten Unterschied der einzelnen Werte, d.h. also einen 100 %igen Wiederfund der Bioaktivität nach DC (Tab. 4). Das gleiche Ergebnis wurde erzielt, wenn die Lage der IES auf der Platte mit Hilfe von kurzzeitigem UV-Licht bestimmt wurde. Auch hier ergab die statistische Berechnung, daß die Punkte der Eichkurve und die Werte des IES-Eluats bei gleicher Molarität sich nicht signifikant voneinander unterschieden, d.h. keinen Verlust der Bioaktivität im Eluat nach DC (Tab. 5). Die Bestrahlungsdauer der IES mit UV sollte jedoch 1 Minute nicht überschreiten, da KALDEWEY u. STAHL (1964) bei 1 Minute Bestrahlungsdauer der IES auf DC mit kurzzeitigem UV ebenfalls keinen, bei 5 Min. aber 10 % und mit langwelligem UV sogar 20 % Verlust der Bioaktivität fanden.

Tab. 4: Zuwachsgrößen des authentischen IES-Eluates nach Markierung mit van Urk und der dazugehörigen Eichkurve mit den Werten der statistischen Berechnung des Biotestes (t oder Student-Test)

Eichkurve		Eluatwerte		statist. Vergleich			
[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	S_D mm	t	f	α %
10^{-3}	$2,06 \pm 0,13$	10^{-3}	$2,35 \pm 0,13$	0,20	1,45	37	12,5
10^{-4}	$8,81 \pm 0,11$	10^{-5}	$9,05 \pm 0,15$	0,19	0,42	36	>25
10^{-5}	$9,13 \pm 0,11$	10^{-7}	$6,07 \pm 0,13$	0,23	0,96	38	25
10^{-6}	$7,55 \pm 0,12$						
10^{-7}	$5,85 \pm 0,13$						
10^{-8}	$4,84 \pm 0,11$						
H ₂ O	$5,49 \pm 0,12$						

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel der Zuwachsgrößen von Weizenkoleoptilen mit 10 mm Ausgangslänge

m = mittlere Fehler des arithmetrischen Mittels

$\bar{x} \pm m$ = Streubreite des Mittelwertes

S_D = mittlere Fehler der Differenz der beiden Mittelwerte (Eichkurve, Eluatkurve) der jeweiligen IES-Konzentration

t = Grad der Signifikanz

f = Zahl der Freiheitsgrade

α = Grad der Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der beiden Mittelwerte ($\alpha \leq 0,05$: signifikanter Unterschied, $\alpha \geq 2,5$: kein signifikanter Unterschied)

Tab. 5: Zuwachsgrößen des authentischen IES-Eluats nach Markierung mit UV und der dazugehörigen Eichkurve mit den Werten der statistischen Berechnung des Biotestes

Eichkurve		Eluatwerte		statist. Vergleich			
[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	S_D mm	t	f	α %
10^{-3}	1,75 $\pm$ 0,11	10^{-3}	1,51 $\pm$ 0,12	0,22	1,09	25	25
10^{-4}	8,75 $\pm$ 0,11						
10^{-5}	9,06 $\pm$ 0,12	10^{-5}	8,70 $\pm$ 0,15	0,22	1,64	38	12,5
10^{-6}	7,70 $\pm$ 0,14						
10^{-7}	4,71 $\pm$ 0,11	10^{-7}	4,93 $\pm$ 0,15	0,19	1,16	27	25
H ₂ O	3,80 $\pm$ 0,12						

1.2.2. Nachweis der Bioaktivität der IES-Gesamtmenge sowie der freien IES aus Haferkaryopsen

Nachdem im Vorversuch mit authentischer IES kein Verlust der Bioaktivität zu verzeichnen war, konnte nun die aus Haferkaryopsen extrahierte und chromatographisch gereinigte IES im Biotest eingesetzt werden. Getestet wurde sowohl die freie IES als auch die IES-Gesamtmenge. Da die freie IES aus 37,5 g Karyopsen ($\hat{=}$ 50 g Körner) isoliert wurde, ließ sich die Ausgangsmolarität des IES-Eluates nach DC mit $0,41 \times 10^{-5} M$ errechnen. Dieses IES-Eluat (14,25 μg IES/20 ml) wurde dann für den Biotest 1:5, 1:10 und 1:50 verdünnt (Abb. 1a). Die Gesamtmenge an IES wurde aus dem Hydrolysat von 3 g Karyopsen ($\hat{=}$ 4 g Körner) gewonnen, womit sich eine Molarität des IES-Eluates (30,52 μg IES/15 ml) nach DC von $1,14 \times 10^{-5} M$ ergab. Für den Biotest wurde dann diese Lösung 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt (Abb. 1b).

In beiden Fällen ergaben sich entsprechende Kurven mit einem gegenüber den Eichkurven jeweils verschobenem Maximum. Erst ab einer Molarität von $10^{-7} M$ IES war kein signifikanter Unterschied der Werte mehr zu errechnen (Tab. 6 u. 7).

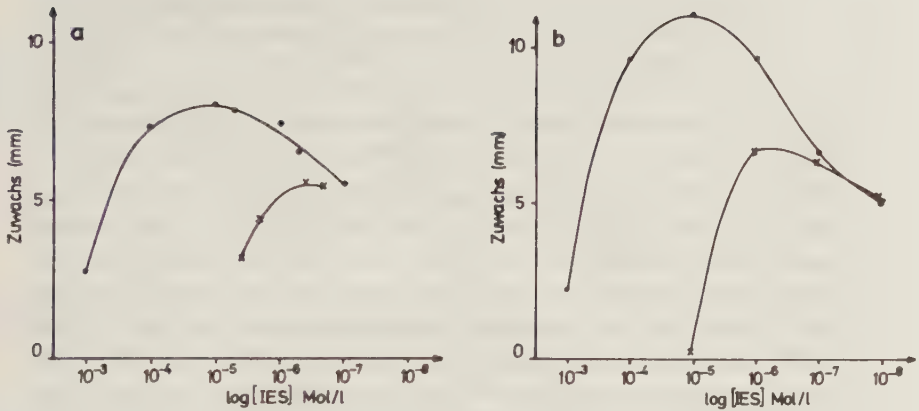


Abb. 1: Darstellung der über Biotest (Koleoptilzylindertest) ermittelten Wachstumskurven verschiedener IES-Eluate aus Haferkaryopsen nach DC
: Eichkurve x—x—x—x : Eluatkurve
 a: Eluat der freien IES (Zuwachs der Zylinder in reinem Wasser: 4,09 mm)
 b: Eluat der IES-Gesamtmenge (Zuwachs der Zylinder in reinem Wasser: 5,15 mm)

Tab. 6: Zuwachsgrößen des Eluates der freien IES aus Haferkaryopsen nach DC und der dazugehörigen Eichkurve mit den Werten der statistischen Berechnung des Biotestes

Eichkurve		Eluatkurve		statist. Vergleich			
[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	S_D mm	t	f	α %
10^{-3}	$2,71 \pm 0,11$						
10^{-4}	$7,33 \pm 0,14$						
10^{-5}	$8,04 \pm 0,14$						
5×10^{-6}	$7,87 \pm 0,14$	$4,10 \times 10^{-6}$	$3,17 \pm 0,13$	0,19	24,74	27	<0,05
10^{-6}	$7,60 \pm 0,14$	$2,07 \times 10^{-6}$	$4,42 \pm 0,18$				
5×10^{-7}	$6,53 \pm 0,13$	$4,10 \times 10^{-7}$	$5,59 \pm 0,12$	0,17	5,53	29	<0,05
10^{-7}	$5,54 \pm 0,12$	$2,07 \times 10^{-7}$	$5,48 \pm 0,11$				
H ₂ O	$4,09 \pm 0,10$						

Erklärung der verwendeten Bezeichnungen s. Tab. 4 (S. 47)

Tab. 7: Zuwachsgrößen des Eluates der gesamten IES aus Haferkaryopsen nach DC und der dazugehörigen Eichkurve mit den Werten der statistischen Berechnung des Biotestes

Eichkurve		Eluatkurve		statist. Vergleich			
[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	S_D mm	t	f	α %
10^{-3}	2,22 $\pm$ 0,19						
10^{-4}	9,65 $\pm$ 0,08						
10^{-5}	11,04 $\pm$ 0,20	$1,14 \times 10^{-5}$	0,20 $\pm$ 0,11	0,22	49,27	16	<0,05
10^{-6}	9,65 $\pm$ 0,18	$1,14 \times 10^{-6}$	6,67 $\pm$ 0,12	0,21	14,19	18	<0,05
10^{-7}	6,56 $\pm$ 0,14	$1,14 \times 10^{-7}$	6,38 $\pm$ 0,22	0,25	0,72	20	25
10^{-8}	5,00 $\pm$ 0,22	$1,14 \times 10^{-8}$	5,27 $\pm$ 0,22	0,31	0,87	21	25
H ₂ O	5,15 $\pm$ 0,21						

Erklärung der verwendeten Bezeichnungen siehe Tab. 4 (Seite 47)

1.2.3. Nachweis der Bioaktivität eines "Wachstumshemmstoffes" im IES-Eluat nach DC

Die Verschiebung der beiden IES-Eluatkurven gegenüber den Eichkurven könnte erklärt werden mit dem Vorliegen eines bioaktiven Hemmstoffes, der mit zunehmender Verdünnung des Eluates an Wirksamkeit verliert und nach einer 100-fachen Verdünnung keine Wirkung mehr zeigt, da sich Eichkurve und Eluatkurve nicht mehr unterscheiden. Für diese Annahme würden die Ergebnisse von HEMBERG (1958) an Maiskörnern sprechen, der auf Chromatogrammen des Ätherextraktes bei einem R_f -Wert von 0,1 und 0,5 eine hemmende Substanz, dazwischen von 0,2 bis 0,4 eine im Biotest aktive Zone ermittelte. Auch KALDEWEY und STAHL (1964) haben in verschiedenen Pflanzen Hemmstoffe mit gleichen oder sehr ähnlichen R_f -Werten wie die der IES nachgewiesen. Da Abscisinsäure (ABA), ein weitverbreiteter endogener Hemmstoff des Pflanzenwachstums, von GOLDBACH und MICHAEL (1976) auch in Gerstenkörnern nachgewiesen werden konnte, wurde der R_f -Wert von ABA im Vergleich zu dem der IES bestimmt. Unter UV konnte eindeutig erkannt werden, daß die beiden Substanzen im getesteten Fließmittel identische R_f -Werte besitzen, d.h. also, falls ABA in den Haferkaryopsen vorläge, würde sie gemeinsam mit der IES von der Platte eluiert und im Biotest eingesetzt werden.

Tab. 8: Zuwachsgrößen des Eluates der gesamten IES nach Vor-
extraktion mit Äther bei pH = 7 und der dazugehörigen
Eichkurve mit den Werten der statistischen Berechnung
des Biotestes

Eichkurve		Eluatkurve		statist. Vergleich			
[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	S_D mm	t	f	α %
10^{-3}	2,75 $\pm$ 0,17						
10^{-4}	9,13 $\pm$ 0,22						
10^{-5}	10,85 $\pm$ 0,20	$1,14 \times 10^{-5}$	4,40 $\pm$ 0,16	0,25	25,80	24	<0,05
10^{-6}	9,80 $\pm$ 0,15	$1,14 \times 10^{-6}$	8,13 $\pm$ 0,21	0,25	6,68	21	<0,05
10^{-7}	6,80 $\pm$ 0,23	$1,14 \times 10^{-7}$	7,11 $\pm$ 0,19	0,29	1,07	21	25
10^{-8}	5,60 $\pm$ 0,17	$1,14 \times 10^{-8}$	6,06 $\pm$ 0,22	0,28	1,64	25	12,5
H ₂ O	5,15 $\pm$ 0,21						

Tab. 9: Statistischer Vergleich der Zuwachsgrößen der beiden
Gesamt-IES-Eluatkurven mit und ohne Vorextraktion bei
pH = 7

Eluatkurve mit Vor- extraktion bei pH=7		Eluatkurve ohne Vorreinigung		statist. Vergleich			
[IES] Mol/l	$\bar{x}$ mm	[IES] Mol/l	$\bar{x}$ mm	S_D mm	t	f	α %
$1,14 \times 10^{-5}$	4,40	$1,14 \times 10^{-5}$	0,20	0,22	19,09	23	<0,05
$1,14 \times 10^{-6}$	8,13	$1,14 \times 10^{-6}$	6,67	0,24	6,08	18	<0,05
$1,14 \times 10^{-7}$	7,11	$1,14 \times 10^{-7}$	6,38	0,29	2,52	21	2,5
$1,14 \times 10^{-8}$	6,06	$1,14 \times 10^{-8}$	5,27	0,31	2,55	18	2,5

Erklärung der verwendeten Bezeichnungen siehe Tab. 4 (Seite 47)

1.2.3.2. Erhöhung der IES-Konzentration im Eluat der freien IES wie der IES-Gesamtmenge durch Zusatz von authentischer IES

Da die Verringerung der Konzentration des "Hemmstoffes" bei
gleichbleibender IES-Konzentration ein erhöhtes Wachstum zeigte,
wurde nun getestet, wie sich der Kurvenverlauf bei gleicher
Hemmstoffkonzentration, aber erhöhter IES-Konzentration verän-
dert. Nach Isolierung der freien IES über DC und Einstellen des

IES-Eluates ($14,25 \mu\text{g}/15 \text{ ml}$) auf eine Molarität von $5,4 \times 10^{-6} \text{ M}$ wurde durch Zugabe von $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ authentischer IES-Lösung im Verhältnis 100:1 (v:v) eine $1,03 \times 10^{-5} \text{ M}$ IES-Ausgangslösung ($15 \text{ ml} \Delta 27,25 \mu\text{g}$ IES) erhalten. Für den Biotest wurde diese Lösung im Verhältnis 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Mit diesem Lösungsgemisch aus IES-Eluat ($\Delta 14,11 \mu\text{g}$ IES) und authentischer IES ($\Delta 13,14 \mu\text{g}$ IES) ergab sich im Biotest eine Kurve, die im Vergleich zur freien IES-Eluatkurve ohne Zusatz von authentischer IES verschoben war (Abb. 3). Bei 10^{-5} M und 10^{-6} M IES unterschieden sich die Punkte der Eichkurve signifikant von denen der Eluatkurve (Tab. 10). Die Erhöhung der IES-Konzentration im Eluat um den Faktor ca. 2 mit authentischer IES zeigte bei der Ausgangskonzentration gleiche Hemmwirkung wie das Eluat der freien IES ohne Zusatz. Bei Verdünnen dieser Lösung mit der höheren Ausgangskonzentration ($1,03 \times 10^{-5} \text{ M}$ IES) wurde hingegen ein stärkerer Längenzuwachs beobachtet als bei dem Eluat mit einer Ausgangskonzentration von $0,41 \times 10^{-5} \text{ M}$ IES.

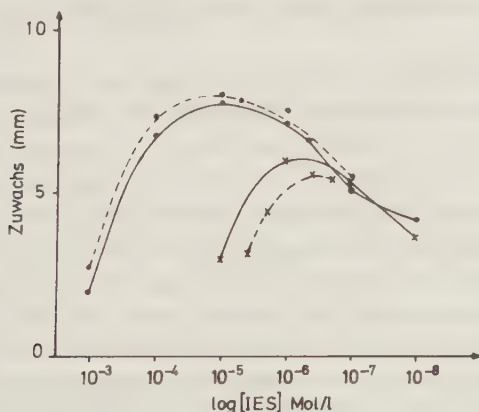


Abb. 3: Vergleich der über Biotest (Koleoptilzylindertest) ermittelten Wachstumskurve des Eluates der freien IES (= $14,11 \mu\text{g}$) + zugesetzter authentischer IES (= $13,14 \mu\text{g}$) mit der der freien IES ohne Zusatz (Zuwachs der Zylinder in reinem Wasser: $4,09 \text{ mm}$)

●—●—●—	Eichkurve	} freie + authentische IES
x—x—x—	Eluatkurve	
●---●---	Eichkurve	} freie IES
x---x---	Eluatkurve	

Tab. 10: Zuwachsgrößen des Eluates der freien IES (= 14,11 μg) + zugesetzter authentischer IES (= 13,14 μg) und der dazugehörigen Eichkurve mit den Werten der statistischen Berechnung des Biotests

Eichkurve		Eluatkurve		statist. Vergleich			
[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	S_D mm	t	f	α %
10^{-3}	1,96 $\pm$ 0,19						
10^{-4}	6,78 $\pm$ 0,20						
10^{-5}	7,78 $\pm$ 0,19	$1,03 \times 10^{-5}$	2,98 $\pm$ 0,14	0,23	20,87	25	<0,05
10^{-6}	7,20 $\pm$ 0,23	$1,03 \times 10^{-6}$	5,88 $\pm$ 0,20	0,32	4,12	25	<0,05
10^{-7}	5,14 $\pm$ 0,21	$1,03 \times 10^{-7}$	5,38 $\pm$ 0,21	0,23	1,04	26	25
10^{-8}	4,05 $\pm$ 0,20	$1,03 \times 10^{-8}$	3,63 $\pm$ 0,18	0,28	1,50	24	12,5
H ₂ O	4,09 $\pm$ 0,10						

Erklärung der verwendeten Bezeichnungen siehe Tab. 4 (Seite 47)

Aus den beiden letzten Versuchen, einmal mit Vorextraktion des IES-Eluates, zum anderen mit Erhöhung der IES-Konzentration im Eluat, muß gefolgert werden, daß durch Verdünnung der jeweiligen Ausgangslösungen die Wirkung des "Hemmstoffes" reduziert wird und dadurch die Wirkung der IES eher zum Tragen kommt. Da nach einer 100-fachen Verdünnung der Ausgangslösungen die Eluatkurven immer in die Eichkurven übergehen, ist ab diesem Punkt die Wirkung des "Hemmstoffes" aufgehoben und deshalb wird nur das durch IES hervorgerufene Längenwachstum gemessen. Ausgehend von den über DC ermittelten IES-Werten wird jedoch die IES-Konzentration durch diese Verdünnung bereits soweit herabgesetzt (etwa 10^{-7}M), daß zwar die Wirkung der IES noch nachgewiesen werden kann, aber diese auf das Längenwachstum nur noch gering ist. Aufgrund dieses Befundes kann aus den beiden Kurvenverläufen keine sichere Aussage über die jeweilige IES-Ausgangskonzentration in den Eluaten gemacht werden. Da aber sowohl nach Vorextraktion des IES-Eluates die Wirkung des "Hemmstoffes" erheblich reduziert worden ist und bereits nach einer Verdünnung von 1:10 die Koleoptilen ein maximales Längenwachstum zeigen, als auch durch Zusatz von authentischer IES die Wirkung des "Hemmstoffes" während der einzelnen Verdünnungsschritte teilweise aufgehoben wird, war nun zu prüfen, ob es möglich ist, durch Zusatz von authentischer IES

die Wachstumskurve des IES-Eluats der Eichkurve anzugleichen. Deshalb wurde das $1,14 \times 10^{-5} \text{ M}$ Eluat der IES-Gesamtmenge mit authentischer 10^{-1} M IES-Lösung angereichert, bis das Lösungsgemisch eine Konzentration an IES von $1,01 \times 10^{-3} \text{ M}$ (2,66 mg IES/15 ml) aufwies. Mit dieser Ausgangslösung, die sich aus IES-Eluat (0,03 mg IES) und authentischer IES (2,63 mg) zusammensetzte, und der damit hergestellten Verdünnungsreihe bis zu einer IES-Konzentration von $1,01 \times 10^{-8} \text{ M}$ wurde eine Kurve im Biotest erhalten (Abb. 4), die genau der Eichkurve entsprach und sich davon in keinem Punkt signifikant unterschied (Tab. 11).

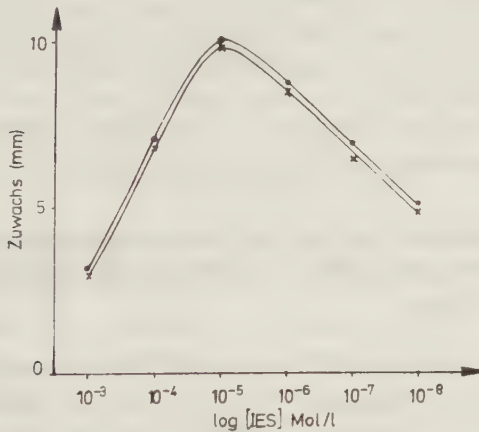


Abb. 4: Darstellung der über Biotest (Koleoptilzylindertest) ermittelten Wachstumskurve des Eluats der IES-Gesamtmenge (0,03 mg) mit zugesetzter authentischer IES (2,63 mg) (Zuwachs der Zylinder in reinem Wasser: 5,20 mm)

●—●—: Eichkurve

x—x—x: Eluatkurve

Tab. 11: Zuwachsgrößen des Eluats der IES-Gesamtmenge (0,03 mg) mit zugesetzter authentischer IES (2,63 mg) und der dazugehörigen Eichkurve mit den Werten der statistischen Berechnung des Biotests

Eichkurve		Eluatkurve		statist. Vergleich			
[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	[IES] Mol/l	$\bar{x} \pm m$ mm	S_D mm	t	f	α %
10^{-3}	3,15 $\pm$ 0,18	$1,01 \times 10^{-3}$	2,95 $\pm$ 0,23	0,30	0,67	19	>25
10^{-4}	7,11 $\pm$ 0,16	$1,01 \times 10^{-4}$	6,82 $\pm$ 0,22	0,28	1,04	18	25
10^{-5}	0,11 $\pm$ 0,23	$1,01 \times 10^{-5}$	9,85 $\pm$ 0,18	0,29	0,90	17	25
10^{-6}	8,87 $\pm$ 0,18	$1,01 \times 10^{-6}$	8,50 $\pm$ 0,15	0,23	1,61	16	12,5
10^{-7}	7,00 $\pm$ 0,20	$1,01 \times 10^{-7}$	6,50 $\pm$ 0,19	0,30	1,67	19	12,5
10^{-8}	5,14 $\pm$ 0,19	$1,01 \times 10^{-8}$	4,85 $\pm$ 0,21	0,29	1,00	16	25
H ₂ O	5,20 $\pm$ 0,20						

Erklärung der verwendeten Bezeichnungen siehe Tab. 4 (Seite 47)

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Wirkung des im Eluat enthaltenen "Hemmstoffes" durch eine hohe (ca. 100-fache) IES-Konzentration aufgehoben werden kann.

Zusammenfassend ergibt sich deshalb die Überlegenheit der chemischen IES-Bestimmung gegenüber dem Biotest, da letzterer durch Hemmstoffe gestört werden kann, erstere jedoch nicht.

1.3. Gaschromatographie des IES-Methylesters

Bei dem Versuch, elektrophoretisch getrennte Proteinbanden auf IES zu untersuchen (vgl. 3.1.3.), ergab sich, daß die quantitative IES-Bestimmung auf DC-Platten (untere Nachweisgrenze 2 μ g, SCHMALTZ, 1973) dazu zu unempfindlich war. Deshalb mußte nach einer weiteren IES-Bestimmungsmethode gesucht werden, deren Empfindlichkeit bis in den ng-Bereich reichen sollte. Angeregt durch eine Kurzmitteilung von PRZYBYLLOK und NAGL (1977) über eine Mikrotechnik zur IES-Bestimmung aus Pflanzenteilen mittels gekoppelter GC-MS nach Silylierung wurde zunächst einmal versucht, IES zu methylieren und anschließend im GC zu identifizieren.

1.3.1. Methylierung von authentischer IES und Nachweis des Esters im GC

2 mg authentische IES ließen sich mit Diazomethan in einem wasserfreien Äther-Methanolgemisch innerhalb 2 Stunden vollständig zum Methyl ester derivatisieren. Nach Einspritzung von 3 µl aus 1 ml Lösung erschien dieser Ester im GC nach einer Retentionszeit von 10,5 min. bei 155°C Säulentemperatur. Der Vergleich mit einer unter denselben Bedingungen ins GC gespritzten Probe authentischen IES-Methyl-Esters, die die gleiche Konzentration wie die Probe der methylierten IES aufwies, zeigte, daß sowohl die Retentionszeiten der beiden Ester als auch die Fläche und Höhe ihrer Peaks völlig identische Werte ergaben. Damit war erwiesen, daß sich die Derivatisierung der IES in einer quantitativen Umsetzung zum Methyl-Ester vollzog und daß dieser Ester mit einem 100 %igem Wiederfund im GC identifiziert werden konnte. Mit authentischem Material konnte so noch eine Menge von 1 ng quantitativ erfaßt werden.

1.3.2. Methylierung der IES des ersten P-2 Peaks und Nachweis des Esters sowohl über GC als auch DC

Um zu prüfen, ob sich mit einer über Gelfiltration vom Rohextrakt abgetrennten IES-haltigen Fraktion ein auswertbares Gaschromatogramm erhalten ließ, wurde der erste P-2 Peak (vgl. 3.1.3.) getestet. Da in diesem Peak (Δ der salzfreien Fraktion des 3. AcA-Peaks) die IES gebunden vorlag, mußte die IES hydrolytisch abgespalten und das Hydrolysat zur Reinigung und Isolierung der IES einer sauren Ätherextraktion unterworfen werden. Nach dem Einengen der getrockneten Ätherphase mit N₂ folgte die Methylierung mittels Diazomethan. Anschließend konnte der IES-Methyl ester dieser Probe im GC chromatographiert werden. Die Retentionszeit, die durch Einspritzen mit authentischem IES-Ester bestimmt wurde, betrug unter den diesmal angewandten Bedingungen 13,5 min. (Abb. 5).

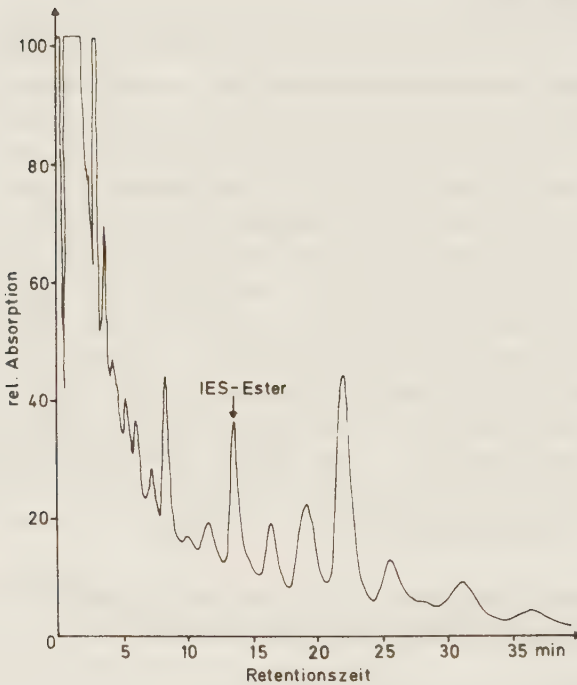


Abb. 5: Gaschromatogramm des IES-Methylesters (Retentionszeit = 13,5 min) aus dem ersten P-2 Peak ($\hat{=}$ 122 ng IES)

T_S	: 150°C	Einspritzmenge:	3 μ l aus 200 μ l
N_2	: 135 ml/min	Verstärkung	: 8×10^{-11}
H_2	: 50 ml/min	Lösungsmittel	: n-Hexan/Aceton
Lüft	: 300 ml/min		(1:1 = v:v)

Vergleicht man auf dem GC-Chromatogramm die beiden Peakflächen der methylierten authentischen IES (3 μ l $\hat{=}$ 6 μ g IES) und des IES-Esters der ersten P-2 Fraktion (Abb. 5), die beide unter den gleichen Temperatur- und Gasbedingungen eingespritzt worden sind, so errechnet sich daraus ein IES-Gehalt von 122 ng in 3 μ l der ersten P-2 Fraktion. Daraus folgt eine Menge von 8,13 μ g in 200 μ l ($\hat{=}$ 5 g Karyopsen), was einem IES-Gehalt von 122 μ g in

75 g Karyopsen entspricht. Das stimmt mit dem in der ersten P-2 Fraktion densitometrisch über die DC ermittelten IES-Gehalt von $120 \pm 10 \mu\text{g}/75 \text{ g Karyopsen}$ (vgl. 3.1.1.) sehr gut überein. Um aber ganz sicher zu gehen, auch wirklich dem Peak mit der Retentionszeit von 13,5 min. den IES-Methylester zuordnen zu können, wurde authentischer IES-Methylester gemeinsam mit der methylierten ersten P-2 Fraktion im Verhältnis 1:2 ins GC gespritzt. Aus der schulterfreien Vergrößerung des IES-Esterpeaks auf dem Chromatogramm konnte geschlossen werden, daß es sich bei den beiden Estern um dieselbe Substanz handelte.

Zur Bestätigung wurde die methylierte IES aus dem ersten P-2 Peak mittels DC untersucht. Auf Kieselgelplatten G waren sowohl im Fließmittel I (vgl. 6.4.) als auch im Fließmittel II (Abb. 6) die R_f -Werte vom authentischen IES-Methylester und der methylierten IES aus dem ersten P-2 Peak identisch (Fließmittel I: R_f Ester = 0,93; Fließmittel II: R_f = 0,53). Da freie IES in der methylierten ersten P-2 Probe nicht mehr gefunden wurde, war auch hier die Umsetzung der IES in den Ester quantitativ verlaufen (Fließmittel I: R_f IES = 0,4).

1.3.3. Nachweis des IES-Esters im GC nach DC

Da bedingt durch den Arbeitsgang (Atherextraktion, Methylierung) und den dabei verwendeten Lösungsmitteln Verunreinigungen in die Probe und damit ins GC gebracht wurden und diese durch das Einengen der Probe angereicherten Substanzen stärkere Signale im GC ergaben als der IES-Methylester selbst, sollten zur besseren und eindeutigeren Identifizierung des Esters diese Verunreinigungen vor dem GC-Lauf aus den Proben entfernt werden. Vor allem bei Proben mit wenig IES-Gehalt ist sonst eine Erkennung des Esterpeaks nicht mehr möglich, da die gleichbleibende Menge der Begleitsubstanzen im GC wesentlich größere Peaks in bezug auf den kleiner werdenden Esterpeak ergeben. Als Möglichkeit zur Reinigung der IES-haltigen Fraktion nach der Methylierung bot sich die DC an, da beim Chromatographieren der methylierten ersten P-2 Fraktion im Fließmittel II (vgl. 6.4.) beobachtet worden war, daß sich mit van Urk gelb anfärbbare Begleitsubstanzen sowohl oberhalb als auch unterhalb des Esters abtrennen ließen (Abb. 6). Nach dieser DC-Reinigung sollte im GC selbst bei höchster Empfindlichkeit eine eindeutige Zuordnung des IES-Esterpeaks möglich sein.

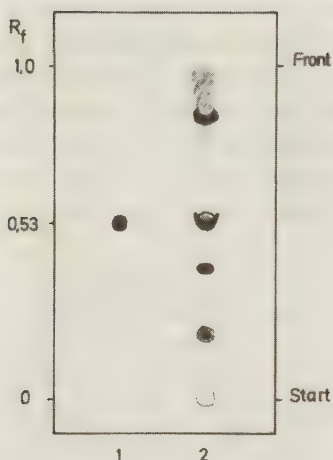


Abb. 6: Dünnschichtchromatogramm der methylierten ersten P-2 Fraktion

Platte : Kieselgel G 60 F₂₅₄
Glasfertigplatte Merck
Fließm.: Aceton:Benzol = 10:90
Sprühh.: van Urk Reagenz

1: p.a. IES-Methylester
2: methylierte erste P-2 Fraktion

1.3.3.1. GC mit authentischem IES-Methylester nach DC

Da aber erst einmal zu testen war, ob sich der IES-Methylester von der DC-Platte nach deren Entwicklung ohne Verluste eluieren läßt, wurde im Vorversuch authentischer IES-Methylester nach dem Lauf in Fließmittel II (vgl. 6.4.) von der verwendeten Kieselgelplatte G 60 F₂₅₄ eluiert und ins GC gespritzt, wo nun ein ganzes Spektrum von Peaks im Bereich des Esters aufgezeichnet wurde. Wie die Blindprobe mit eluiertem Kieselgel zeigte, waren die zusätzlichen störenden Signale auf Substanzen aus dem Plattenmaterial (z.B. Fluoreszenzindikator, Bindemittel) zurückzuführen. Erst die Blindprobe mit einer Aluplatte Kieselgel Si verlief positiv im GC, d.h. in der Umgebung des Methylesters erschienen keine störenden Signale. Nach Chromatographie von 2 μ l authentischem IES-Methylester (= 80 ng) in Fließmittel II (vgl. 6.4.) auf Aluplatte konnte jetzt der im Bereich des R_f -Wertes von 0,45 bis 0,60 eluierte Ester im GC mit einem 100 %igen Wiederfund identifiziert werden, wie der Vergleich mit dem GC-Chromatogramm von 2 μ l (= 80 ng) IES-Esterlösung zeigte, die direkt eingespritzt worden war.

1.3.3.2. Prüfung der Effektivität der Reinigung des IES-Esters
aus dem ersten P-2 Peak über DC anhand des GC

Um nun den Reinigungseffekt der DC am IES-haltigen ersten P-2 Peak zu prüfen, wurde die Probe nach Methylierung auf DC chromatographiert. Nach dem Lauf im Fließmittel II (vgl. 6.4.) wurden sowohl die Esterzone als auch die restlichen Zonen vom Start bis zur Front von der Platte eluiert und die Lösungen ins GC gespritzt (Abb. 7), nachdem zuvor mit Hilfe des Esterstandards die für die Ausbildung der maximalen Peakhöhe notwendigen Gasbedingungen ermittelt worden waren. Bei diesen veränderten Bedingungen betrug die Retentionszeit des IES-Methylesters, der eindeutig nur in der von der DC-Platte eluierten Esterzone zu identifizieren war, 13,6 min. (Abb. 7).

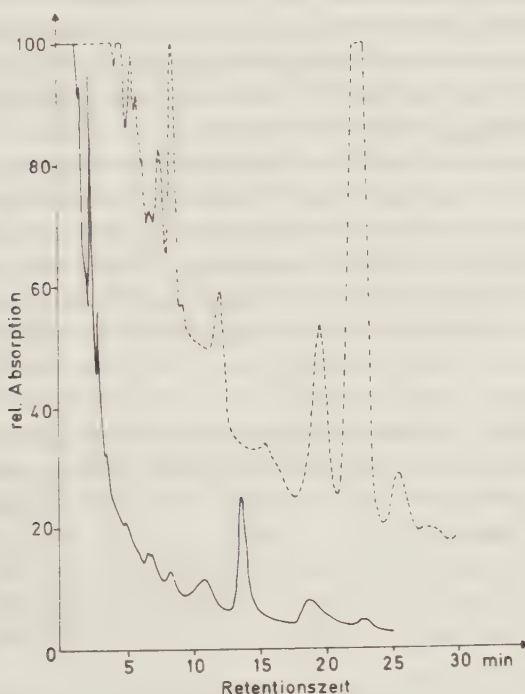


Abb. 7: Gaschromatogramme der nach DC der ersten P-2 Fraktion eluierten IES-Methylesterzone (—) und der Zone oberhalb des Esters bis zur Front (----)

T _S : 150°C	Einspritzmenge: 4 µl aus 50 µl
N ₂ : 135 ml/min	Verstärkung : 128 x 10 ⁻¹²
H ₂ : 50 ml/min	Lösungsmittel : n-Hexan/Aceton
Luft : 400 ml/min	(1:1 = v:v)

Im Vergleich zum Gaschromatogramm des Esters ohne vorherige DC ist der Reinigungseffekt deutlich zu sehen. In der Zone oberhalb des Esters bis zur Front wurden alle Begleitsubstanzen angereichert gefunden, die im GC beim Lauf des nicht über DC gereinigten Esters ebenfalls mit großen Peaks erfaßt worden waren. In der Zone vom Start bis unterhalb des Esters wurden dagegen wesentlich weniger Begleitsubstanzen, die im GC Signale geben, abgetrennt.

1.4. Vergleich der verschiedenen getesteten Methoden

Allen getesteten Methoden zur IES-Bestimmung mit Extrakten aus Haferkaryopsen ist die Isolierung und Reinigung der IES durch saure Ätherextraktion nach KOTAKA et al. (1965) gemeinsam. Um Angaben über den IES-Gehalt mittels einer quantitativen auswertbaren Farbreaktion machen zu können, muß dieser Ätherextrakt über DC aufgetrennt und die IES von Begleitstoffen gereinigt werden. Erst dadurch ist es nach ZIMMERMANN und RÜDIGER (1976) möglich, die IES anhand des R_f-Wertes zu identifizieren und nur den mit chemischen Reagenzien angefärbten Fleck der IES über die Farbintensität am Densitometer auszumessen. Weder die Bildung von IES ausgehend vom möglicherweise vorhandenem Indolyl-Pyruvat, wie sie ATSUMI et al. (1976) beobachteten, die aber nicht bestätigt werden kann, noch p-Cumarsäure selbst, wie BANDURSKI und SCHULZE (1974) meinen, wirken sich dabei störend auf die IES-Bestimmung aus. Da aber die IES-Eichkurve nur im Bereich von 1-10 µg linear verläuft (ZIMMERMANN u. RÜDIGER, 1976) und aufgrund des 50 %igen Arbeitsverlustes (KNEGT u. BRUINSMA, 1973) bei dieser Methode, wird zur exakten IES-Bestimmung eine Mindestmenge von 2 µg IES im zu untersuchenden Extrakt benötigt. Im angegebenen Bereich ist dieser IES-Nachweis aber zuverlässig und ohne großen Zeitaufwand durchführbar.

So konnten durch den Biotest (Koleoptilzylindertest) nach Zugabe von authentischer IES zu den verschiedenen Eluaten der freien IES als auch der IES-Gesamtmenge aus Haferkaryopsen die über DC ermittelten Werte als richtig erkannt werden. Jedoch ist eine IES-Bestimmung mit Hilfe des Biotestes wegen der Gegenwart eines

"Wachstumshemmstoffes" (z.B. p-Cumarsäure oder Abscisinsäure), der trotz Reinigung der Ätherextrakte über DC in den Eluat en vorliegt, nicht möglich. Diese Aussage wird von ELLIOTT und LEOPOLD (1953) bestätigt, die zum überwiegenden Teil in den Spelzen, aber auch in den Karyopsen von Avena sativa einen wasserlöslichen Keimungshemmstoff nachweisen, der in der Lage ist, einen durch IES hervorgerufenen Längenzuwachs bei Segmenten von etioliierten Erbsenkeimlingen zu vermindern.

Die GC-Methode, deren Ergebnis ebenfalls mit dem über DC ermittelten Wert bezüglich des IES-Gehaltes in Haferkaryopsen sehr gut übereinstimmt, zeichnet sich zwar durch wesentlich höhere Empfindlichkeit (10^3 -fach) gegenüber der chemischen Methode aus, verlangt aber dafür auch einen wesentlich größeren Zeitaufwand. Bei hoher Empfindlichkeit der Messung ist die Reinigung des IES-Esters über DC zur exakten Identifizierung im GC notwendig, wobei zu achten ist, daß weder über Plattenmaterial noch über Lösungsmittel Verunreinigungen in die Probe gebracht werden, da diese störende Signale im GC verursachen können. Dieses aufwendige und arbeitsintensive IES-Bestimmungsverfahren sollte deshalb als Nachweisgrenze nur dem ng-Bereich vorbehalten sein, da die einfachere und schnellere Methode aufgrund der chemischen Farbreaktion der IES in diesem Bereich versagt.

Da die getesteten Methoden übereinstimmende Ergebnisse lieferten, kann also an der Exaktheit und Genauigkeit der weiterhin durchgeführten IES-Bestimmungen nicht gezweifelt werden.

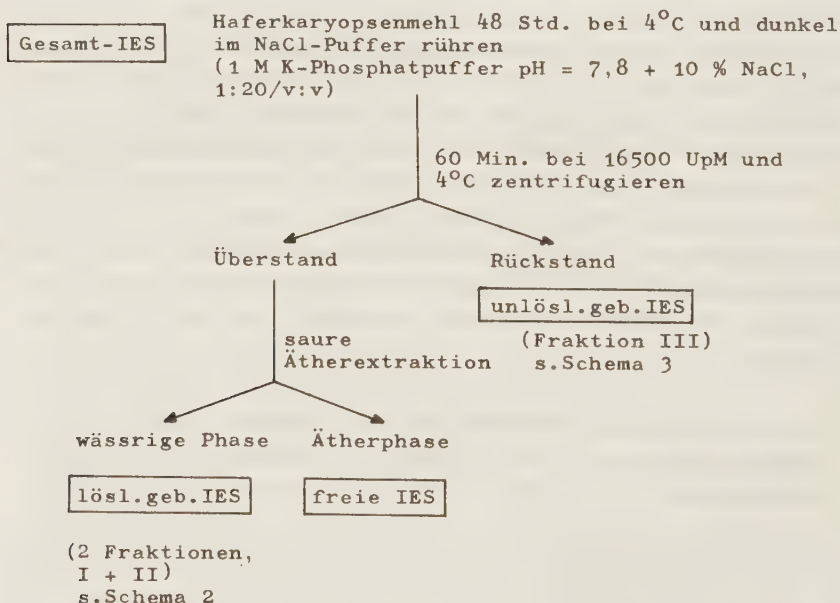
2. Untersuchungen zur Extraktion verschiedener IES-haltiger Fraktionen aus Haferkaryopsen und deren quantitative IES-Bestimmung

Da nach PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) sowie nach ZIMMERMANN et al. (1976) in Haferkörnern die IES an Protein gebunden vorliegen soll und ZIMMERMANN (1978) aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit der gebundenen IES-Fraktion das Vorliegen von mindestens 2 verschiedenen IES-haltigen Verbindungen in Haferkaryopsen folgerte, erschien es sinnvoll, zunächst mittels Extraktionen verschiedene IES-haltige Fraktionen aus Haferkaryopsen zu gewinnen. Da aus einer dieser Fraktionen eine IES-Verbindung angereichert und isoliert werden sollte, mußte die Effektivität des verwendeten Extraktionsverfahrens durch jeweilige quantitative IES-

Bestimmungen (DC-Methode) geprüft werden. Zudem konnten danach zur Stabilisierung der IES und zur Erhöhung der IES-Ausbeute die Bedingungen gegebenenfalls auch noch verändert werden.

2.1. Extraktion mit 10 %iger NaCl-Lösung

Aus dem Mehl der Haferkaryopsen wurde die kovalent gebundene IES nach der von ZWISSLER (1962) angegebenen Methode zur Extraktion der Globuline und Albumine freigesetzt. Die lösliche gebundene IES (aus 4 g Karyopsen), ebenso wie die freie IES (aus 25 g Karyopsen) lagen dabei nach Zentrifugation im Überstand des NaCl-Puffer-Extraktes vor, während die im Rückstand verbliebene IES (aus 4 g Karyopsen) als unlösliche gebundene IES bezeichnet wurde (Schema 1).



Schema 1: Aufteilung der freien und gebundenen IES aus Haferkaryopsen im NaCl-Pufferextrakt

Zur IES-Bestimmung mußte sowohl die lösliche als auch die unlösliche gebundene Form der IES hydrolytisch gespalten werden. Die Gesamtmenge an IES wurde nach der 48-stündigen Extraktion von 2 g Karyopsen durch Hydrolyse aus dem gesamten NaCl-Pufferansatz gewonnen. Die daraus resultierende Verteilung der IES-Menge aus Haferkaryopsen, die nach Ätherextraktion und DC ermittelt wurde, ist in Tab. 12 zusammengefaßt.

Tab. 12: Freie und ungebundene IES im Überstand und Rückstand des NaCl-Pufferextraktes sowie Gesamtmenge an IES aus Haferkaryopsen (75 g Δ 100 g Haferkörnern) nach 48-stündiger Extraktion, Fehlergrenze $\pm$ 8 %.

	ug/100 g Körner			
	freie IES	lösl.geb.IES	unlösl.geb.IES	gesamte IES
Mittelwert aus 3 Bestimmungen	64 $\pm$ 5	415 $\pm$ 33	482 $\pm$ 39	1034 $\pm$ 83

Wie man aus Tab. 12 ersehen kann, wird durch die NaCl-Pufferextraktion die gleiche Menge an freier IES erhalten wie durch Methanolextraktion (vgl. Tab. 2). Von der nachgewiesenen Menge an gebundener IES konnten 46 % im Puffer extrahiert werden, der Rest verblieb im Rückstand. Bei der Verteilung der gebundenen IES auf Überstand und Rückstand erwies sich übrigens das Verhältnis der Karyopsenmenge zum Puffervolumen als ganz entscheidend (Tab. 13).

Tab. 13: Menge an löslicher gebundener IES im Pufferextrakt mit Prozentangabe (100 % Δ Summe lösl. + unlösl. geb.IES) bei unterschiedlichen Verhältnissen von a:b (a = Karyopsenmenge in g, b = Puffervolumen in ml), Fehlergrenze $\pm$ 8 %

a : b	lösl.geb.IES	
	ug/100 g Körner	% der geb.IES-Menge
1 : 5	187 $\pm$ 15	22
1,5 : 10	311 $\pm$ 25	35
1 : 10	416 $\pm$ 33	47
1 : 20	403 $\pm$ 32	45

Da ein 1:10 Verhältnis der Karyopsen- zur Puffermenge bereits die größte Ausbeute an gebundener IES im Überstand des Pufferextraktes bewirkte, und da aufgrund der leichteren Zugänglichkeit mit dieser löslichen gebundenen IES-Fraktion weitergearbeitet werden sollte, wurde bei allen folgenden Ansätzen dieses Verhältnis eingehalten.

2.1.1. Auftrennung des salzlöslichen IES-haltigen Extraktes und Untersuchungen zur Stabilisierung der IES

Bei der Auftrennung des in der UZ klarzentrifugierten Überstandes der NaCl-Extraktion, der die lösliche kovalent gebundene IES enthält (ZIMMERMANN et al., 1976), mittels Gelfiltration über eine Acrylex P-2 Säule (5/35 cm) mit 10^{-3} M K-Phosphatpuffer pH = 7,0, wurde zwar im 1. Peak (= Hauptpeak) der Proteinanteil nach der Biuretmethode mit 50 % bestimmt, aber die IES ließ sich nach Hydrolyse und DC nur mehr in geringen Spuren nachweisen. Dadurch erwies sich die lösliche kovalent gebundene IES im Pufferextrakt als sehr instabil.

Ebenfalls auch nur mit Zersetzung der IES während der Extraktion kann die geringere Ausbeute an IES-Gesamtmenge von 1,034 mg/100 g Körner im Puffer (Tab. 12) gegenüber der IES-Menge von 1,509 mg/100 g Körner, die sich im Parallelversuch nach sofortiger Hydrolyse der Karyopsen freisetzen ließ, erklärt werden. Da sowohl im Methanol- (Tab. 2) als auch im Pufferextrakt (Tab. 12) übereinstimmende Mengen an freier IES gefunden wurden, kann der Verlust nur auf Zerstörung der gebundenen IES zurückzuführen sein, von der nur mehr 61 % der ursprünglich im Rückstand des Methanolextraktes (vgl. Tab. 2) vorliegenden IES-Menge, verteilt auf Überstand und Rückstand des NaCl-Ansatzes, gefunden wurden. Wahrscheinlich ist der Verlust an gebundener IES als Folge eines enzymatischen Abbaus (hydrolytisch bzw. oxidativ) zu sehen. Deshalb erschien es sinnvoller, erst einmal nur die gebundene IES aus dem Rohextrakt der löslichen IES-Fraktion (Schema 1) zu isolieren und zu versuchen, diese von den Enzymen zu trennen, die die gebundene IES während Aufarbeitung und Gelfiltration angreifen und abbauen.

2.1.1.1. Trennung durch Ammonsulfatfällung und Entsalzen der IES-haltigen Proteinfraktion

Um aus dem Überstand des gepufferten NaCl-Ansatzes (Schema 1) IES-haltige Proteinfractionen zu erhalten, wurden Proteinfällungen mit festem Ammonsulfat bei 0°C durchgeführt. Zunächst wurde der aus 30 g Karyopsen hergestellte Pufferextrakt von 0-60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung fraktioniert gefällt und die IES jeweils im Proteinniederschlag nach Hydrolyse, Ätherextraktion und DC bestimmt, um einen Überblick über die mengenmäßige Verteilung der löslich gebundenen IES auf die einzelnen Proteinfractionen zu erhalten. Nach mehrmaliger Wiederholung dieser Bestimmungen ergaben sich die in Tab. 14 zusammengefaßten Mittelwerte.

Tab. 14: Verteilung der löslich gebundenen IES des Pufferextraktes aus Haferkaryopsen auf die durch fraktionierte Ammonsulfatfällung erhaltenen Proteinniederschläge

% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung	0-20	20-40	40-60	60-80	80-100	100-120	120-Überstand *
$\mu\text{g IES}/100 \text{ g Körner}$	25	60	87	54	117	136	96

* in diesem Überstand ist auch die freie IES enthalten

Wie man aus Tab. 14 ersehen kann, wurde in den Proteinniederschlägen einschließlich des Überstandes der letzten Fällung insgesamt 235 $\mu\text{g IES}/100 \text{ g Körner}$ gefunden, was nur 49 % der ursprünglich nach sofortiger Hydrolyse des Pufferextraktes vorliegenden IES-Menge entspricht (vgl. Tab. 12). Auch hier tritt also während der Proteinfällungen mit Ammonsulfat bei 0°C wieder eine wahrscheinlich zeitabhängige Zersetzung der IES ein, aber im Gegensatz zur Gelfiltration des gesamten Pufferextraktes (vgl. 2.1.1.) konnte hier die IES in den Proteinfractionen noch quantitativ bestimmt werden, während im Proteinsäulenpeak nur mehr geringe IES-Spuren zu finden waren. Der Hauptanteil der gebundenen IES (68 %) fällt dabei bei einer Ammonsulfatsättigung zwischen 20-60 % aus. Da bis 20 % Sättigung mehr Fremdproteine und Verunreinigungen als gebundene IES gefällt werden, läßt sich

zusätzlich ein Reinigungseffekt erzielen, wenn man diese Fraktion von der mit 20-60 % Sättigung an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ abtrennt. Ebenso liegt im Überstand der 60 %-Fällung nach Abzug der freien IES (Tab. 12) nur mehr wenig gebundene IES vor, so daß auch diese Fraktion verworfen werden kann.

Um mit der bei 20-60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung ausgefällten IES-haltigen Fraktion weiterarbeiten zu können, mußte diese zunächst entsalzt werden. Nach Gelfiltration über Biogel P-2 mit dest. Wasser konnten jedoch lediglich im 3. Säulenpeak Spuren von freigesetzter IES, im 1. Proteinpeak hingegen überhaupt keine gebundene IES mehr gefunden werden. Ebenfalls ungeeignet zum Entsalzen der Probe erwies sich Dialyse, da nach 4 Stunden erst etwa $1/4$ der Salzmenge bei 10-minütigem Pufferwechsel ins Außenmedium (dest. Wasser) übergegangen war und nach 48-stündiger Dialyседauer ebenfalls keine IES mehr nachgewiesen werden konnte. Offensichtlich tritt sowohl auf der Säule als auch im Dialyseschlauch bei abnehmender Salzkonzentration eine Zersetzung der gebundenen IES ein. Für diese Annahme spricht der Befund, daß bei Verwendung einer 1 %igen NaCl-Lösung bei der Extraktion der gebundenen IES daraus freigesetzte IES gefunden wird, wohingegen bei noch geringerer Salzkonzentration eine Zerstörung der IES stattfindet, z.B. beträgt der IES-Verlust bei Extraktion mit reinem 10^{-2}M Puffer 80 %.

Erst bei der Auftrennung des 20-60 % Proteinniederschlages der Ammonsulfatfällung über Biogel P-2 mit 10^{-3}M Phosphatpuffer pH = 7,0 konnten im 1. Peak (IES-Verbindung I, vgl. Schema 6) 41 % als gebundene IES (Δ 56 $\mu\text{g}/100$ g Körner), im 2. Peak keine IES und im 3. Peak 8 % (Δ 11 $\mu\text{g}/100$ g Körner) als freie IES der aufgetragenen gebundenen IES-Menge von 137 $\mu\text{g}/100$ g Körner gefunden werden. Dennoch muß auch bei dieser Säulentrennung ein IES-Verlust von über 50 % in Kauf genommen werden. Geht man aber von der ursprünglich im Überstand des Pufferextraktes vorliegenden Menge von 415 μg gebundener IES/100 g Körner aus (vgl. Tab. 12) und vergleicht mit der IES-Menge von 56 $\mu\text{g}/100$ g Körner, die nach Ammonsulfatfällung und Säulentrennung der IES-haltigen Fraktion (20-60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) im 1. Peak wiedergefunden wird, so erscheint der Verlust (= 87 %) während der Aufarbeitung sehr hoch. Deshalb wurde nach einem System gesucht, das es ermöglicht, die gebundene IES während der Aufarbeitung vor Zersetzung und Abbau zu schützen.

2.1.1.2. Extraktion und Trennung mit Zusatz von Ascorbinsäure und PMSF

Da BETZ (1964) eine Hemmung des oxidativen Abbaus der IES durch Ascorbinsäure beobachtete, wurde eine neue Extraktionspufferlösung zusammengestellt, die neben 10 % NaCl 10^{-1} M Imidazol, 10^{-2} M Ascorbinsäure und 10^{-5} M PMSF enthielt, das nach FAHRNEY u. GOLD (1963) zur Inaktivierung von hydrolytischen Enzymen dient. Mit diesem Puffer sollte es nun möglich sein, sowohl der hydrolytischen enzymatischen Spaltung als auch dem oxidativen Abbau der IES entgegenzuwirken. Um den Stabilisierungseffekt des neuen Extraktionsmediums auf die IES zu testen, wurde die unter 2.1. (Schema 1) beschriebene Auftrennung der gebundenen IES in eine lösliche und unlösliche Proteinfraktion mit dem neuen Extraktionspuffer wiederholt. Nach der IES-Bestimmung der einzelnen Fraktionen mittels DC-Methode ergaben sich die in Tab. 15 zusammengestellten Werte.

Tab. 15: Freie und gebundene IES im Überstand und Rückstand des NaCl-Pufferextraktes unter Zusatz von Ascorbinsäure und PMSF sowie Gesamtmenge an IES aus Haferkaryopsen (75 g Δ 100 g Körner) nach 48-stündiger Extraktion, Fehlergrenze $\pm$ 8 %.

	ug/100 g Körner			
	freie IES	lösl.geb.IES	unlösl.geb.IES	gesamte IES
Mittelwert aus 3 Bestimmungen	56 $\pm$ 5	363 $\pm$ 29	370 $\pm$ 30	785 $\pm$ 63

Vergleicht man die Werte aus Tab. 15 mit denen aus Tab. 12, so sieht man, daß zwar die extrahierten Mengen an freier IES sich in etwa entsprechen, aber die an löslicher gebundener und vor allem an unlöslicher gebundener IES und damit auch die Gesamtmenge an IES nicht mehr die Werte erreichen, die aus demselben Saatgut nach der NaCl-Pufferextraktion ohne Zusätze (Tab. 12) bestimmt wurden. Da aber zwischen den beiden IES-Bestimmungen einmal nach Extraktion mit reinem NaCl-Puffer und zum anderen mit Zusatz von Ascorbinsäure und PMSF im Puffer über ein Jahr vergangen war, läßt sich die Abnahme der gebundenen IES, die HEMBERG (1955) ebenfalls bereits schon nach Messungen im Abstand

von 4 Monaten bei Maiskörnern gefunden hat, mit der dazwischen liegenden längeren Lagerzeit der Haferkörner erklären.

Im Anschluß an die IES-Bestimmungen des Pufferextraktes mit Zusatz von Ascorbinsäure und PMSF wurde nun die Proteinfraction, die die lösliche gebundene IES enthielt, fraktioniert mit Ammonsulfat bei 0°C gefällt (vgl. 2.1.1.1.) und wiederum nach mehrmaligen Wiederholungen die Verteilung der IES auf die einzelnen Proteinniederschläge bestimmt (Tab. 16).

Tab. 16: Verteilung der löslich gebundenen IES des Ascorbinsäure- und des PMSF-haltigen Pufferextraktes aus Haferkaryopsen auf die durch fraktionierte Ammonsulfatfällung erhaltenen Proteinniederschläge

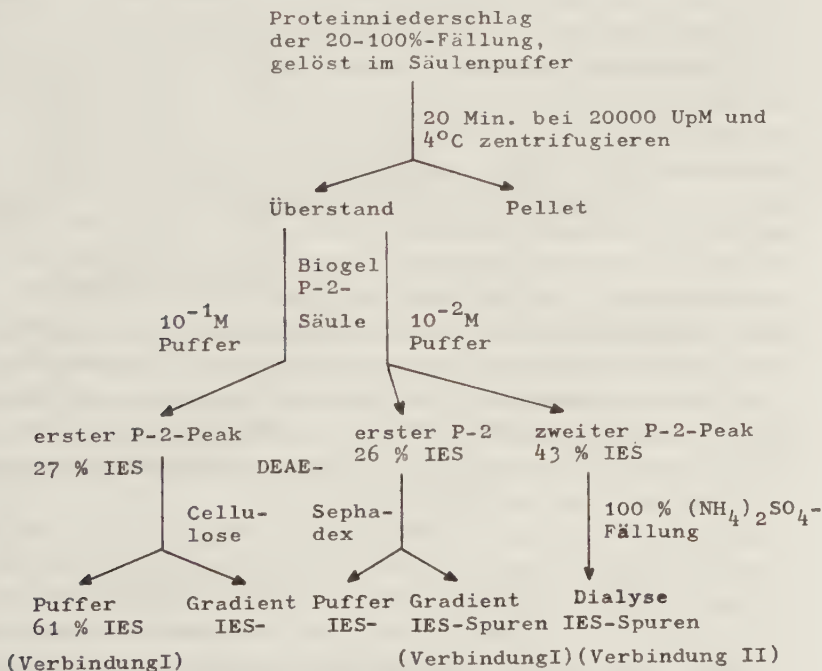
% (NH ₄) ₂ SO ₄ - Sättigung	0-20	20-100	0-100	100-Überstand*
/µg IES/100 g Körner	36	257	285	106

* hier liegt immer nur freie IES vor

Mit diesem neuen Extraktionspuffer ließen sich nun tatsächlich größere Ausbeuten an gebundener IES nach Ammonsulfatfällung gewinnen. Insgesamt konnten im Proteinniederschlag 285 µg gebundene IES/100 g Körner und im 100 %-Überstand 106 µg freie IES/100 g Körner nachgewiesen werden. Ohne Zusatz von Ascorbinsäure und PMSF wurden im Proteinniederschlag nur 136 µg IES/100 g Körner und im 60 %-Überstand 96 µg IES/100 g Körner gefunden (vgl. Tab. 14). Damit war bei Verwendung des Ascorbinsäure- und PMSF-haltigen Puffers die Ausbeute an gebundener IES um mehr als das Doppelte gestiegen, da sich aus diesem Pufferextrakt die darin enthaltene IES quantitativ, verteilt auf Niederschlag und Überstand nach Ammonsulfatfällung, extrahieren ließ im Gegensatz zur früheren Aufarbeitung ohne Zusatz von Ascorbinsäure und PMSF, bei der insgesamt nur mehr 49 % der ursprünglich vorliegenden IES-Menge nach Ammonsulfatfällung gefunden werden konnten. Damit war der Stabilisierungseffekt des neuen Extraktionspuffers auf die IES deutlich zu erkennen. Da aber die im Über-

stand nach der 100 %-Ammonsulfatfällung vorliegende Menge an freier IES von 106 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ Körner die ursprünglich im Extrakt bestimmte Menge von 56 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ Körner (Tab. 15) wesentlich übertraf, muß daraus gefolgert werden, daß zwar der oxidative Abbau der IES durch Zusatz von Ascorbinsäure und PMSF bei Pufferextraktion und Ammonsulfatfällung weitgehend unterbunden wurde, aber eine Spaltung der gebundenen IES teilweise immer noch stattfand.

Im Gegensatz zu früher wurde jetzt aber nicht mehr mit der zwischen 20-60 % Sättigung an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällten Proteinfraktion (IES-Gehalt: 117 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ Körner, Tab. 14) weitergearbeitet, sondern mit der Proteinfraktion, die bei einer Ammonsulfat-sättigung von 20-100 % ausfiel und 257 μg gebundene IES/100 g Körner enthielt. So konnte mit dem neuen Puffersystem, trotz geringerer Ausgangsmenge an löslicher gebundener IES im Extrakt, bedingt durch das zunehmende Alter der Haferkörner, eine ausgefällte Proteinfraktion erhalten werden, die mehr als 2 mal soviel IES im Vergleich zu früher enthielt.



Schema 2: Übersicht der Auftrennung des Proteinniederschlages der Ammonsulfatfällung bei 20-100 % Sättigung

Zur weiteren Auftrennung (Schema 2) dieser nach Fällung mit Ammonsulfat (20-100 % Sättigung) erhaltenen Proteinfraktion mußte zunächst das Sulfat über Biogel P-2 abgetrennt werden. Dazu wurde der Proteinniederschlag im Säulenpuffer gelöst, wobei im abzentrifugierten Pellet (= denaturiertes Protein) 29 μg IES/100 g Körner (Δ 11 %) nach Hydrolyse und DC nachgewiesen wurden. Der Überstand wurde dann über eine Biogel P-2-Säule mit 10^{-1}M Imidazolpuffer/ 10^{-5}M PMSF pH = 7,0 aufgetrennt, wobei der Wiederfund der aufgetragenen IES-Menge im 1. Peak 27 % (Δ 62 μg IES/100 g Körner) entsprach. Jetzt wurde versucht, das sulfatfreie Eluat dieses 1. Peaks der P-2-Säule über eine DEAE-Cellulosesäule weiter aufzutrennen. Bei Verwendung des 10^{-1}M Imidazolpuffers/ 10^{-5}M PMSF pH = 7,0 wurde die IES-Verbindung I (Schema 2) aber nicht an die DEAE-Cellulose gebunden, sondern 61 % (Δ 38 μg IES/100 g Körner) der aufgetragenen IES-Menge sowie der größte Teil der gesamten Proteine sofort im Puffer wieder eluiert. Da möglicherweise durch den Salzgehalt des ersten P-2 Eluates die Bindung an die Cellulose verhindert worden war, wurde bei der nächsten Aufarbeitung für die Entsalzung der Ammonsulfatfraktion (20-100 %) die Molarität des Elutionspuffers der P-2 Säule um den Faktor 10 erniedrigt (Schema 2). Bei dieser insgesamt dreimal durchgeführten Trennung verteilte sich die gebundene IES immer auf den 1. Peak der P-2 Säule mit 26 % (Δ 59 μg IES/100 g Körner) und auf den 2. Peak mit 43 % (97 μg IES/100 g Körner) der aufgetragenen IES-Menge. Es wurde nun wieder versucht, das Eluat des sulfatfreien ersten P-2 Peaks (IES-Verbindung I, Schema 2) im Batchverfahren auf DEAE-Sephadex A 50 mit einem Gradienten von 0-1 M KCl zu trennen, während das Eluat des 2. Säulenpeaks (IES-Verbindung II, Schema 2) zur Konzentrierung der Proteine mit Ammonsulfat bis zu 100 %-Sättigung ausgefällt wurde, wobei sich nach Fällung im Überstand keine IES nachweisen ließ. Anschließend wurde versucht, den aufgelösten IES-haltigen Proteinniederschlag mittels Dialyse zu entsalzen (Schema 2).

Sowohl Proteine des 1. Peaks der P-2 Säule als auch die IES-Verbindung I (Schema 2) wurden jetzt zwar jeweils in ganz geringer Menge an den Austauscher gebunden und bei einer Salzkonzentration von 0,25 M KCl im Puffer vom DEAE-Sephadexgel wieder eluiert, aber weder im Puffer noch in den Eluaten mit steigenden Salzkonzentrationen konnte die Hauptmenge der gebundenen IES

(Verbindung I) gefunden werden; d.h. daß offensichtlich der überwiegende Teil der gebundenen IES (Verbindung I) im Verlauf des Batchverfahrens irreversibel geschädigt worden war. In der nach Ammonsulfatfällung des zweiten P-2 Peaks mittels Dialyse entsalzten IES-haltigen Proteinfraktion (IES-Verbindung II, Schema 2) konnten nach 48-stündiger Dialysedauer bei 4°C gegen 10^{-2} M Imidazolpuffer/ 10^{-5} M PMSF pH = 7,0 ebenfalls nur mehr geringe Spuren IES nach Hydrolyse und DC gefunden werden.

Da also trotz Zusatz von Substanzen, die der Zerstörung der gebundenen IES teilweise entgegenwirken, sich die IES-Verbindungen (I + II, Schema 2) bei weiterer Auftrennung des ersten und des zweiten P-2-Peaks als instabil erwiesen, d.h. daß jeweils nur mehr Spuren von IES vorhanden waren (Schema 2), wurde nach einem anderen Verfahren zur Extraktion von kovalent gebundener IES gesucht, um damit eventuell eine stabilere IES-Fraktion zu isolieren.

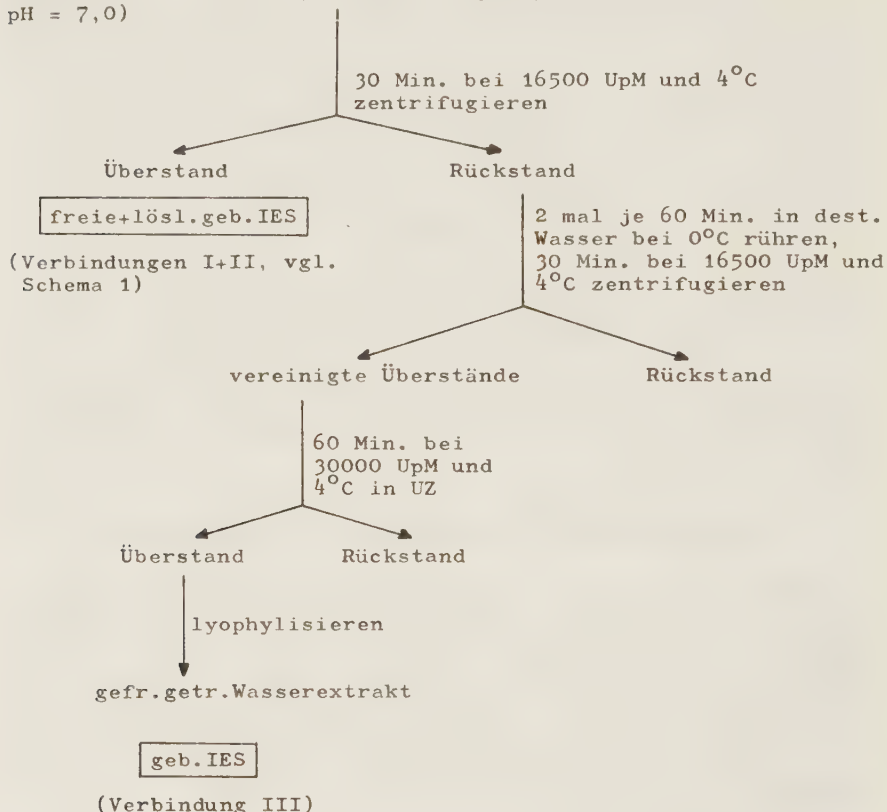
2.1.2. Auftrennung des Rückstandes nach NaCl-Extraktion

Da LEBEDEV et al. (1976) durch Extraktion mit 10 %iger NaCl-Lösung und anschließender Wasserextraktion eine Auftrennung der Körnerproteine in Albumine, Globuline und Prolamine erreicht hatten, wurde versucht, dieses Verfahren auf den Rückstand des NaCl-Pufferextraktes der Haferkaryopsen zu übertragen, woraus sich so eine Albuminfraktion isolieren lassen müßte, die nach ZIMMERMANN (1978) gebundene IES enthalten sollte.

2.1.2.1. Wasserextraktion

Aus dem Mehl der Haferkaryopsen wurde nach 12-stündiger Extraktion mit 10 %iger NaCl-Pufferlösung die freie und die lösliche gebundene IES nach Zentrifugation im Überstand abgetrennt und danach die gebundene IES, die der Albuminfraktion angehört, aus dem Rückstand durch Wasserextraktion freigesetzt (Schema 3).

Haferkaryopsenmehl 12 Std. bei 4°C und dunkel im NaCl-Puffer rühren (0,01 M Na-Phosphatpuffer/10 % NaCl pH = 7,0)



Schema 3: Isolierung der gebundenen IES von Haferkaryopsen aus dem Rückstand des NaCl-Pufferextraktes

Bei der Extraktion der Karyopsen wurde wieder das 1:10 Verhältnis der Karyopsenmenge zum Puffervolumen eingehalten. So konnten mit dieser Methode aus 10 g Haferkaryopsen von der im Rückstand des NaCl-Pufferextraktes vorliegenden IES-Menge (370 µg/100 g Körner, Tab. 15) durch Wasserextraktion 35 % der gebundenen IES $\triangleq$ 128 µg IES/100 g Körner ohne Abspaltung von freier IES isoliert werden, wie die Bestimmung der freien, als auch gebundenen IES des gefriergetrockneten Extraktes über DC zeigte.

Da sich aber die so isolierte gebundene IES (Verbindung III, Schema 6) nach Auflösen des gefriergetrockneten Extraktes in 10^{-2} M Imidazolpuffer pH = 7,0 nach 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln völlig zersetzt hatte, so daß von der eingesetzten IES-Menge nichts mehr nachweisbar war (Tab. 17), erwies sich diese IES-Fraktion (Verbindung III) ebenfalls wieder als sehr instabil. Deshalb mußte erneut nach einem System gesucht werden, das die Zerstörung der IES verhindern kann.

2.1.2.2. Untersuchungen zur Stabilisierung der IES des Wasserextraktes durch Zusatz von Ascorbinsäure und Hydrochinon

Da nach SONDHEIMER (1964) das pH-Optimum der IES-Oxidase bei pH = 3,5-7,0 liegt und GORTNER u. KENT (1958) die IES-Oxidase durch Wasserextraktion isolierten, ist es wiederum möglich, den IES-Verlust auf enzymatischen Abbau zurückzuführen. Deshalb wurde dem beim Auflösen des gefriergetrockneten Extraktes verwendeten Imidazolpuffer ebenfalls Ascorbinsäure (BETZ, 1964) zugesetzt und danach diese Lösung, die die gebundene IES (Verbindung III) enthielt, bei Raumtemperatur im Dunkeln 1 Stunde gerührt. Da aber der Wiederfund an IES nach Hydrolyse und DC der Pufferlösung nur 48 % betrug, war dieses Versuchsergebnis nicht befriedigend ausgefallen (Tab. 17).

Sowohl SONDHEIMER u. GRIFFIN (1960) als auch GORTNER u. KENT (1958) beschreiben eine Hemmung der IES-Oxidase durch natürliche Phenol-Komponenten mit 2 Hydroxylgruppen am aromatischen Ring. AKAZAWA u. CONN (1958) fanden z.B. mit $1,7 \times 10^{-5}$ M Chlorogensäure keine Zerstörung der IES in Gegenwart von Weizenperoxidase, selbst mit $1,7 \times 10^{-5}$ M Hydrochinon betrug die Hemmung der Peroxidasewirkung ebenfalls 98 %, obwohl nach SONDHEIMER (1964) Chlorogensäure 8 mal wirkungsvoller sein soll als Hydrochinon. Deshalb wurde jetzt der gefriergetrocknete Extrakt in 10^{-2} M Imidazolpuffer pH = 7,0, der 10^{-4} M Hydrochinon enthielt, gelöst und nachdem Aliquots dieser Lösung (20 ml $\hat{=}$ 10 g Karyopsen) bei Raumtemperatur im Dunkeln verschieden lange Zeiten gerührt worden waren, jeweils der IES-Gehalt nach Hydrolyse und DC bestimmt (Tab. 17). Obwohl auf den DC-Platten der verschiedenen Ansätze die mit van Urk angefärbte IES immer in etwa gleicher Menge zu sehen war, konnten diese Flecke am Densitometer wegen störender Farbreaktionen des Hydrochinon mit Imidazol nicht ausgemessen werden.

Tab. 17: Menge an gebundener IES aus dem im jeweiligen Puffer gelösten gefriergetrockneten Wasserextrakt, der bei Raumtemperatur im Dunkeln verschieden lang gerührt worden war

-: hier wurde keine IES-Bestimmung durchgeführt

Rührperiode der Ansätze (20 ml Δ 10g Karyopsen) in Std.	in μg_2 IES/100 g Körner in 10^{-4} M Imidazolpuffer pH = 7,0		
	ohne Zusatz	+ 10^{-2} M Ascorbinsäure	+ 10^{-4} M Hydrochinon
0	125	130	IES +
1	-	62	IES +
2	0	-	IES +

Deshalb wurde der Versuch wiederholt und der gefriergetrocknete Wasserextrakt nicht mehr in Imidazolpuffer, sondern in 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0/ 10^{-4} M Hydrochinon gelöst. Aus den jeweiligen Lösungen (20 ml Δ 10 g Karyopsen) wurde wieder nach unterschiedlichen Aufbewahrungszeiten bei Raumtemperatur und dunkel die IES bestimmt (Tab. 18).

Tab. 18: Menge an gebundener IES aus dem in 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0/ 10^{-4} M Hydrochinon gelösten gefriergetrockneten Wasserextrakt nach verschiedenen langen Aufbewahrungszeiten bei Raumtemperatur im Dunkeln

Zeitdauer in Stunden	0	0,5	0,75	1	4	6	19
μg IES/100 g Körner	129	128	126	132	133	130	130

Wie aus Tab. 18 zu ersehen ist, konnte die gebundene IES (Verbindung III) mit 10^{-4} M Hydrochinon im Puffer über einen Zeitraum bis zu 19 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln völlig stabil gehalten werden.

2.1.2.3. Charakterisierung des Extraktes vor und nach Gelfiltration

Nachdem nun ein System gefunden war, in dem sich die IES-Fraktion (III, Schema 6) stabil verhielt, konnte der aus dem Rückstand des NaCl-Pufferansatzes gewonnene IES-Wasserextrakt (Schema 3) näher untersucht werden.

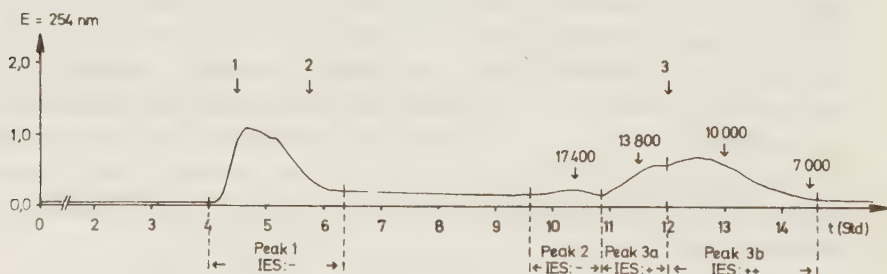
Der Proteinanteil des gefriergetrockneten Extraktes ließ sich nach der Biuret-Methode mit nur 6 % bestimmen, dafür war aber der Zuckeranteil und speziell der der Glucose relativ hoch, was papierchromatographisch nach saurer Hydrolyse festgestellt wurde. Dennoch ergab sich beim Jod-Stärkenachweis keine Blaufärbung. Da bei der PC (eindimensional) der Zucker deutlich geworden war, daß der Rohextrakt einen sehr störenden Salzgehalt aufwies, wurde vor allen weiteren analytischen Untersuchungen dieser IES-Rohextrakt zuerst über eine Biogel P-2 Säule (1/20 cm) mit dest. Wasser entsalzt. Um nun wirklich das Vorliegen von Stärke oder Dextrinen im Wasserextrakt ausschließen zu können, wurde die Ausbeute an Maltose nach enzymatischer Hydrolyse mit β -Amylase über PC (eindimensional) bestimmt, wo aber wiederum fast nur - offensichtlich von Glycosidasen - freigesetzte Glucose und sehr wenig Maltose gefunden wurde. Die nach saurer Hydrolyse über PC (eindimensional) nachgewiesenen Zucker (Glucose, Galaktose, Xylose und Rhamnose) deuten deshalb eher auf das Vorliegen von Glykoproteinen hin (nicht Rhamnose, PIGMAN u. HORTON, 1970), was durch die positive Farbreaktion mit Alcianblau (spezifisch für Glykoproteine) von 3 Banden nach Disc-Gelelektrophorese (pH = 8,8) bestätigt wurde. Mit Coomassieblau konnten sowohl diese 3 Banden als auch zusätzlich noch 2 weitere sichtbar gemacht werden (Abb. 8).

Abb. 8: Disc-Elektrophorese (pH = 8,8) der Proteine des entsalzten IES-haltigen Wasserextraktes nach NaCl-Vorextraktion (50 μ l Δ 0,5 mg Protein)

- 1 = Bandenmuster nach Alcianblaufärbung
2 = Bandenmuster nach Coomassieblaufärbung



Um nun den IES-haltigen Wasserextrakt (Schema 3) weiter aufzutrennen zu können, wurde dieser nach dem Auflösen in $10^{-2}M$ Na-Phosphatpuffer pH = 7,0/ $10^{-4}M$ Hydrochinon bei $2^{\circ}C$ in der UZ klar zentrifugiert und der Überstand über eine Ultrogel AcA 54-Säule (Trennbereich: 6000-70000 Daltons) aufgetrennt. Die gebundene IES (Verbindung III) wurde dabei im 3. Säulenpeak gefunden (Peak 3b mehr IES als 3a), wobei sich nach Eichung der Säule ein Molekulargewicht dieser IES-haltigen Fraktion von 8000-14000 Daltons ergab (Abb. 9). Im Vergleich zum Ultrogel wurde auch Sephadex G 50 getestet, dessen Fraktionierungsbereich von 1500-30000 Daltons reicht. Dabei verteilte sich aber die IES-haltige Fraktion auf ein wesentlich größeres Elutionsvolumen bei einer insgesamt schlechteren Auftrennung des Extraktes. Deshalb wurde für die weiteren Versuche nur mehr die Ultrogel-Säule verwendet.



- 1 = RSA: MG = 67000
- 2 = HSA: MG = 45000
- 3 = Cytochrom c: MG = 12500

Abb. 9: Auftrennung des IES-haltigen Wasserextraktes (Verbindung III) nach NaCl-Puffervorextraktion über eine Ultrogel AcA 54-Säule bei $4^{\circ}C$ (800 mg Extrakt in 12 ml Puffer nach UZ Δ 10 g Karyopsen)
Trennbereich: 6000-70000 Daltons
Säule : 5/40 cm
Puffer : $10^{-2}M$ Na-Phosphatpuffer, pH = 7,0/
 $10^{-4}M$ Hydrochinon
Durchfluß : 70 ml/h

Da die Biuret-Bestimmung der IES-haltigen AcA-Säulenfraktion nach Gefriertrocknung einen Proteingewichtsanteil von nur 0,6 % ergab, wurde diese IES-haltige Fraktion zunächst über eine Biogel P-2 Säule (5/20 cm) mit bidest. Wasser entsalzt. Bei der anschließend mit dem salzfreien Protein-Peak durchge-

fürhten Disc-Elektrophorese (pH = 8,8) trennten 3 Hauptproteinbanden auf, die nach Färbung mit Coomassieblau sichtbar wurden, und wovon eine eindeutig mit Alcianblau als Glykoproteinbande identifiziert werden konnte (Abb. 10a). Ebenfalls für das Vorliegen von Glykoproteinen sprechen die nach saurer Hydrolyse des salzfreien Proteinpeaks (erster P-2 Peak) über PC (eindimensional) wiederum gefundenen Zuckerkomponenten Galaktose, Glucose, Xylose und Rhamnose (nicht Rhamnose, PIGMAN u. HORTON, 1970). Durch Elektrofocussierung wurde für die über AcA abgetrennte und entsalzte IES-haltige Fraktion (Verbindung III) ein IEP-Bereich von pH = 6-10 bestimmt (Abb. 10b).

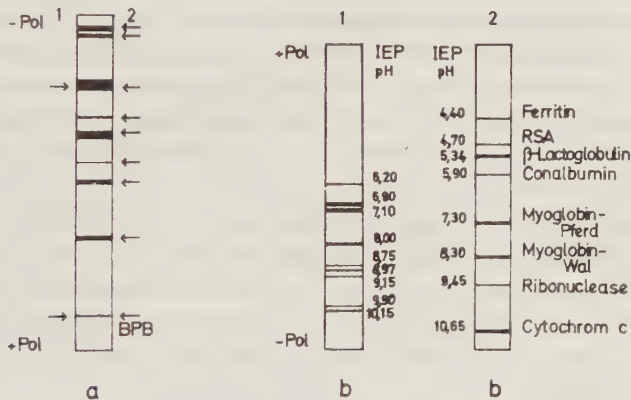


Abb. 10: Elektrophoretische Auftrennung der Proteine des entsalzten IES-haltigen AcA-Peaks des NaCl-Wasserextraktes (= erster P-2 Peak)

a: Disc-Elektrophorese (pH = 8,8), 25 μ l Δ 0,25 mg Protein. Markierung der Banden mit Alcianblau (1) und Coomassieblau (2)

b: Isoelektrische Focussierung (pH = 2-11) der Probe (1), 60 μ l Δ 0,3 mg Protein, und der Eichlösung (2). Proteinfixierung und Markierung mit 20 %iger TCA-Lösung

Die ebenfalls durchgeführte Aminosäurenanalyse nach Hydrolyse der ersten P-2 Fraktion ergab die in Tab. 21 (S.90) zusammengestellten Molverhältnisse der AS zueinander. Die am häufigsten vertretenen AS waren Glutaminsäure und Glycin, dann folgten Alanin, Serin und Asparaginsäure.

Um nun den IES-Gehalt nach Entsalzung der 3. AcA-Fraktion (IES-Verbindung III) mit bidest. Wasser ermitteln zu können, wurde

mit allen Peakeluaten der Biogel P-2 Säule (5/20 cm) eine IES-Bestimmung mittels DC durchgeführt. Da aber außer Spuren gebundener IES (1. Peak, Verbindung III) nur mehr freie IES (3. Peak, NaCl-haltig) gefunden werden konnte, mußte offensichtlich bei dieser Entsalzung eine Abspaltung der IES aus der gebundenen Form (Verbindung III) stattgefunden haben. Bestätigt wurde diese Vermutung aufgrund der Auftrennung des IES-haltigen Wasserhextraktes, der nur gebundene (Verbindung III) und keine freie IES enthält (2.1.2.1.), über diese Biogel P-2 Säule mit bidest. Wasser, wobei - im Gegensatz zur AcA-Säulentrennung (Abb. 9) - aber nur freigesetzte IES nach dem NaCl von der Säule eluiert wurde. Sehr wahrscheinlich wird diese Abspaltung der IES vom Bindungspartner durch den abnehmenden NaCl-Gehalt der Probe auf der Säule ausgelöst, da bei Verwendung einer 1 %igen NaCl-Lösung bei der Extraktion der gebundenen IES ebenfalls eine Abspaltung und bei noch geringerer Salzkonzentration sogar ein Abbau der IES stattfindet.

Obwohl zwar die überwiegende Menge an NaCl nach der Zentrifugation des Pufferextraktes im Überstand vorliegt, aber dennoch auch aus dem Rückstand mittels der Wasserextraktion NaCl gelöst wird, wurde nun nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, gebundene IES zu isolieren, wobei aber kein NaCl mehr verwendet werden sollte.

2.2. Wasserextraktion der Karyopsen nach Entfetten mit n-Butanol

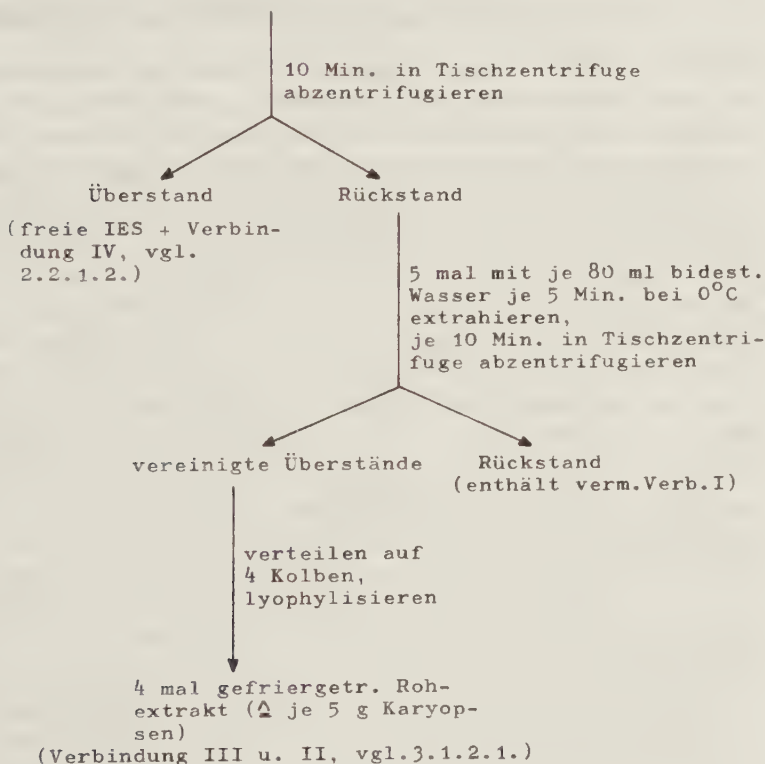
Zur Isolierung gebundener IES aus Haferkaryopsen schien die von GRAHAM (1963) verwendete Methode zur successiven Extraktion verschiedener Proteinfractionen deshalb gut geeignet zu sein, da hier eine Vorbehandlung des Karyopsenmehls mit n-Butanol anstelle der NaCl-Extraktion steht. Zudem sollte es möglich sein, da die IES-haltige Fraktion nach Entfetten der Karyopsen mit n-Butanol direkt durch eine nachfolgende Wasserextraktion gewonnen wird, diese Fraktion sofort, ohne notwendige Entsalzung und damit immer wieder verbundenen IES-Verlusten über Ionenaustauscher aufzutrennen.

2.2.1. Gewinnung des Rohextraktes

2.2.1.1. Wasserextraktion nach Vorbehandlung der Karyopsen

Aus dem Mehl von 20 g Haferkaryopsen wurde die kovalent gebundene IES bei 0°C nach Entfetten mit n-Butanol durch 5 malige successive Wasserextraktion gewonnen (Schema 4). Die freie IES ging dabei in den abzentrifugierten Butanol-haltigen Überstand.

20 g Karyopsenmehl mit 80 ml wassergesättigtem n-Butanol bei 0°C mixen



Schema 4: Isolierung der wasserlöslichen IES-Fraktion aus Haferkaryopsen nach Entfetten mit n-Butanol

Aus dem gefriergetrockneten Rohextrakt von 5 g Karyopsen ließ sich nach Hydrolyse, Ätherextraktion und DC eine gebundene IES-Menge von 310 μ g/100 g Körner ermitteln. Da eine gleichzeitig durchgeführte DC-Bestimmung der Gesamtmenge an IES zeigte, daß der IES-Gehalt der Karyopsen nur mehr 948 μ g IES/100 g Körner betrug, wovon 48 μ g IES/100 g Körner als freie IES nachgewiesen werden konnten, ließen sich daher 34 % der insgesamt vorhandenen gebundenen IES mittels Wasserextraktion aus den mit n-Butanol entfetteten Karyopsen isolieren.

2.2.1.2. Wasserextraktion ohne Vorbehandlung der Karyopsen

NICHOLLS (1967) trennte einen aus Maiskörnern isolierten IES-haltigen Wasserextrakt mit n-Butanol so auf, daß in der Butanolphase 85 % der wasserlöslichen IES-Inositate vorlagen. Auch UEDA u. BANDURSKI (1969) konnten nach Fraktionierung des Wasserextraktes mit Butanol alle in Mais vorliegenden IES-Zuckerester in der Butanolphase finden. Da nun möglicherweise durch das Entfetten mit n-Butanol (Schema 4) aus den Haferkaryopsen neben der freien IES bereits auch Butanol-lösliche IES-Verbindungen extrahiert worden sind, sollte nun geprüft werden, ob nach einer Wasserextraktion mit unentfetteten Haferkaryopsen ebenfalls IES-Inositatester gefunden werden können. Sowohl NICHOLLS (1967) als auch UEDA u. BANDURSKI (1969) wiesen die IES-Zuckerester anhand der DC nach. Deshalb sollte ebenfalls der mittels Wasserextraktion aus nicht entfetteten Haferkaryopsen gewonnene IES-haltige Rohextrakt dünnschichtchromatographisch aufgetrennt werden. Tatsächlich ließ sich so eine IES-Verbindung (IV, Schema 6) finden, die sich gemeinsam mit der freien IES und Tryptophan mit Butanol extrahieren lassen muß, da der aus entfetteten Karyopsen gewonnene wäßrige Rohextrakt (Schema 4) diese von Urk positive Substanz nicht mehr enthält. Auf Alufolie mit Kieselgel GF wies diese IES-Verbindung IV (Schema 6) in allen sechs getesteten Fließmitteln (I-VI, vgl. 6.4.) einen R_f -Wert zwischen 0,30 und 0,99 auf (Tab. 19). Mit Ninhydrin ergab sich keine positive Farb-reaktion. Ihr R_f -Wert unterschied sich von dem aller getesteten Indolverbindungen (IES, Tryptophan, IES-Seryl-, IES-Methylester und Indolyl-acetamid; Tab. 19).

Tab. 19: DC-Chromatographie auf Kieselgel GF (Alufolie) in verschiedenen Fließmitteln (vgl. 6.4.) der in der n-Butanolphase vorliegenden Indolverbindung aus Haferkaryopsen; Bestimmung der R_f -Werte nach Farb-reaktion mit van Urk

Fließ- mittel- systeme	R_f -Werte					
	Indolverb.	Tryptophan	IES	IES-Seryl- ester	IES-Methyl- ester	Indolyl- acetamid
I	0,99		0,34	0,33	0,94	
II	0,30	0,00	0,05	0,00	0,54	0,00
III	0,95	0,51	0,97	0,70		
IV	0,78		0,45	0,00		
V	0,83		0,88	0,18		
VI	0,96	0,16	0,25	0,17		

Die in der von UEDA u. BANDURSKI (1969) aufgetrennten Butanolfraktion vorliegenden IES-Zuckerester (aus Maiskörnern) wurden isoliert und charakterisiert: IES-Myoinositol-Glycoside (UEDA et al., 1970), IES-Myoinositole (EHMANN u. BANDURSKI, 1974) und IES-Glucose (EHMANN, 1974). Da aber keine dieser Substanzen zum Vergleich zur Verfügung stand, muß es offenbleiben, ob die in Haferkaryopsen nachgewiesene IES-Verbindung IV mit einer der beschriebenen Komponenten identisch ist.

Im Wasserextrakt nach NaCl-Extraktion lag diese niedermolekulare IES-Verbindung IV (Schema 6) ebenfalls wie im Wasserextrakt aus entfetteten Karyopsen nicht vor, da nach Eichung der AcA-Säule (Abb. 9) für die IES-haltige Fraktion (Verbindung III, Schema 6) ein MG von 8000-14000 Daltons erhalten wurde. Im Bereich der niedermolekularen Substanzen war hingegen von der Säule keine IES mehr eluiert worden. Da aber die IES-Verbindung III des Wasserextraktes näher untersucht werden sollte, wurde weiterhin nur mehr mit dem aus entfetteten Haferkaryopsen gewonnenem Rohextrakt (Schema 4) gearbeitet, der die IES-Verbindung IV nicht mehr enthält.

2.2.2. Teilweise Charakterisierung des IES-haltigen Extraktes vor und nach Gelfiltration

Zur näheren Charakterisierung des Wasserrohextraktes (Schema 4) wurde dieser vor jeder weiteren Untersuchung zunächst immer im jeweils verwendeten Puffer gelöst und in der UZ klarzentrifugiert,

wobei sich im Rückstand keine IES absetzte. Aus dem gefriergetrockneten Überstand wurde nach der Biuret-Methode der Proteinanteil mit 4,3 % bestimmt, was bei einem Extrakt aus 5 g Karyopsen ca. 20 mg Protein entspricht. Bei der isoelektrischen Focussierung (pH = 2-11) des Rohextraktes wiesen die 3 Hauptproteinbanden einen IEP um den Neutralbereich (pH = 6,9-8,0) auf (Abb. 11).

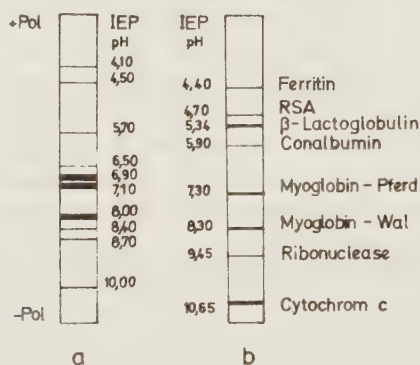


Abb. 11: Isoelektrische Focussierung (pH = 2-11) der Proteine des IES-haltigen Wasserrohextraktes nach Entfetten der Karyopsen mit n-Butanol, 40 μ l Δ 0,2 mg Protein (a) und der Eichlösung (b). Proteinfixierung und Markierung mit 20 %iger TCA-Lösung

Deshalb wurde nun zur Auftrennung des IES-haltigen Rohextraktes versucht, die in der klarzentrifugierten Pufferlösung vorliegenden Proteine sowohl an Anionen- als auch Kationenaustauscher zu binden und mit einem linearen NaCl-Gradienten wieder zu eluieren. Da im Batch-Verfahren mit CM-Cellulose S23 und einem 10^{-1} N Acetatpuffer pH = 5 keine Bindung der IES-Fraktion nachzuweisen war und insgesamt im Pufferdurchfluß nach Hydrolyse über DC nur 189 μ g IES/100 g Körner (1. Puffereluat: 128 μ g, 2. Puffereluat: 61 μ g) = 61 % wiedergefunden wurden, erschien es günstiger, bei den weiteren Versuchen die schonendere Säulentrennung anzuwenden.

So konnte über Säule mit CM-Cellulose zwar die IES quantitativ wieder mit Puffer eluiert werden, aber eine Bindung der IES fand bei pH = 5 nicht statt. In diesem Versuch wurde nur etwa 1/4 der gesamten Proteinmenge an den Ionenaustauscher gebunden.

Bei dem Versuch, die IES-haltige Fraktion an Bio-Rex 70 bei einem pH = 4 zu binden, konnte nur mehr völlige Zersetzung der IES festgestellt werden, obwohl PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) eine ebenfalls aus Hafermehl isolierte, wasserlösliche IES-Esterfraktion bei pH = 3,0 an SP-Sephadex auftrennen, 2/3 der IES-Ester binden und vor allem die IES mit insgesamt 64 % wiederfinden konnten. Auch an DEAE-Cellulose fand bei pH = 8 keine Bindung der IES-haltigen Fraktion statt, wobei hier der IES-Wiederfund im Puffer nur mehr 119 μ g IES/100 g Körner (= 38 %) betrug. Bei Erniedrigung des pH-Wertes auf 7,85 stieg der IES-Wiederfund auf 216 μ g IES/100 g Körner (= 70 %) im Pufferdurchfluß an, aber auch hier war ebenfalls keine Bindung der IES-Fraktion an die DEAE-Cellulose eingetreten (Tab. 20).

Tab. 20: Bestimmung der IES-Menge im Eluat des Puffers (= nicht an Säule gebundene IES-Fraktion) und des NaCl-Gradienten (an Säule gebundene) nach Auftrennung des klarzentrifugierten Rohextraktes über Ionenaustauscher
-: hier wurde bei E = 254 nm kein Peak von der Säule eluiert

Ionenaustauscher- säule bei 4°C	Puffer			/ μ g IES/100 g Körner			
	Substanz	Mol/Liter	pH-Wert	Pufferpeaks			Gradienten- tenpeak
				1.	2.	3.	
CM-Cellulose S23	Na-Acet.	2×10^{-2}	5,00	269	25	-	0
		1×10^{-2}	5,00	291	-	-	0
Bio-Rex 70	Na-Acet.	1×10^{-2}	4,00	0	0	-	0
DEAE-Cellulose 23 SS	Tris-HCl	2×10^{-2}	8,00	0	24	95	0
		1×10^{-2}	7,85	216	-	-	0

Aus Tab. 20 ist ersichtlich, daß die gebundene IES im Extrakt offensichtlich nur bei einem pH-Wert von 5,0-7,5 stabil vorliegt. Da aber in diesem Bereich die gebundene IES immer gemeinsam mit der Hauptmenge aller Proteine im Puffer eluiert wurde und sich nur der geringere Proteinanteil an das Säulenmaterial binden ließ, war zur Auftrennung des Wasserrohextraktes die Chromatographie über Ionenaustauscher ungeeignet.

Deshalb wurde der in der UZ klarzentrifugierte Rohextrakt mittels Gelfiltration ebenfalls über eine Ultrogel AcA-54 Säule aufge-

trennt (Abb. 12). Die gebundene IES wurde dabei im 3. gelb-gefärbten Säulenpeak mit 280 $\mu\text{g}/100$ g Körner und im 4. Peak mit 29 $\mu\text{g}/100$ g Körner wiedergefunden, was insgesamt einem 100 %igen Wiederfund entspricht. Nach Eichung der Säule ergab sich für den Bereich des 3. Peaks ein Molekulargewicht von 7000-13500 Daltons (Abb. 12). Auch mit diesem Wasserextrakt wurde über Sephadex G 50 (Trennbereich: 1500-30000 Daltons) nur eine schlechtere Auftrennung erhalten (vgl. 2.1.2.3.).

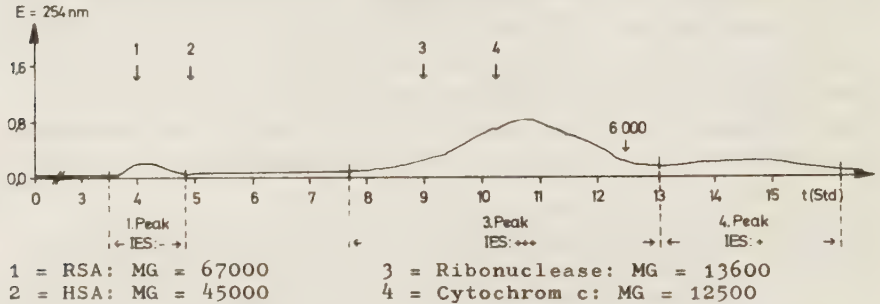


Abb. 12: Auftrennung des IES-haltigen Wasserextraktes nach Entfetten der Karyopsen mit n-Butanol über eine Ultrogel AcA-54 Säule bei 4°C (490 mg gefriergetr. Extrakt in 10 ml Puffer nach UZ Δ 5 g Karyopsen) Trennbereich: 6000-70000 Daltons
Säule : 5/38 cm
Puffer : 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0/
 10^{-4} M Hydrochinon
Durchfluß : 75 ml/h

Nachdem die Biuret-Bestimmung einen Proteingehalt von 1,2 % (= 8,9 mg Protein) des gefriergetrockneten 3. AcA-Peaks lieferte, mußte diese Fraktion zunächst vor weiteren Untersuchungen über eine Biogel P-2 Säule (5/20 cm) mit bidest. Wasser entsalzt werden. Um zu testen, ob sich dieser Extrakt ohne Verlust bzw. Abspaltung der gebundenen IES über Biogel P-2 entsalzen ließ, wurde mit jedem von der Säule eluierten Peak eine IES-Bestimmung mittels DC durchgeführt, wobei im 1. salzfreien Peak 76 μg IES/100 g Körner, im 2. phosphathaltigen Peak 67 μg IES/100 g Körner und im 3. Peak keine IES gefunden wurden. In den beiden IES-haltigen Peaks lag diese dabei immer gebunden vor, freie IES konnte nicht nachgewiesen werden. Insgesamt betrug damit der Wiederfund an gebundener IES nach Entsalzen des 3. AcA-Peaks 51 %. Es sei jetzt bereits darauf

hingewiesen, daß dieser Prozentsatz an IES später noch auf 88 % gesteigert werden konnte (vgl. 3.1.1.)! Im Gegensatz zum Wasserextrakt nach NaCl-Pufferextraktion ließ sich hier also im 1. Peak gebundene IES ohne Abspaltung von freier IES finden (vgl. 2.1.2.3.). Anschließend wurde der Proteingehalt der einzelnen P-2 Peaks nach der Biuret-Methode bestimmt. Im 1. Peak ließen sich damit 3,75 mg, im 2. Peak 2,8 mg und im 3. Peak 1,15 mg Protein nachweisen, was bei einer Ausgangsmenge von 8,8 mg (= Proteingehalt des 3. AcA-Peaks, ausgehend vom Extrakt aus 5 g Karyopsen) insgesamt 87 % entspricht. Mit Hilfe verschiedener weiterer Bestimmungsmethoden wurde der Proteingehalt der ersten P-2 Fraktion später aber nochmals überprüft (vgl. 3.2.2.1.).

Als nächstes wurde mit der salzfreien IES-haltigen Fraktion (= erster P-2 Peak) sowohl eine Disc-Elektrophorese (pH = 8,8) als auch eine Focussierung (pH = 2-11) durchgeführt, um weitere Angaben über die in dieser Fraktion enthaltenen Proteine zu erhalten. Nach Anfärben (Coomassieblau) und Fixieren (20 % TCA) der Gelbanden wurden diese jeweils am Densitometer bei 583 nm zur prozentualen Proteinbestimmung ausgemessen. Sowohl bei der isoelektrischen Focussierung als auch bei der Disc-Elektrophorese trennte der erste P-2 Peak in 4 Hauptproteinbanden auf (Abb. 13).

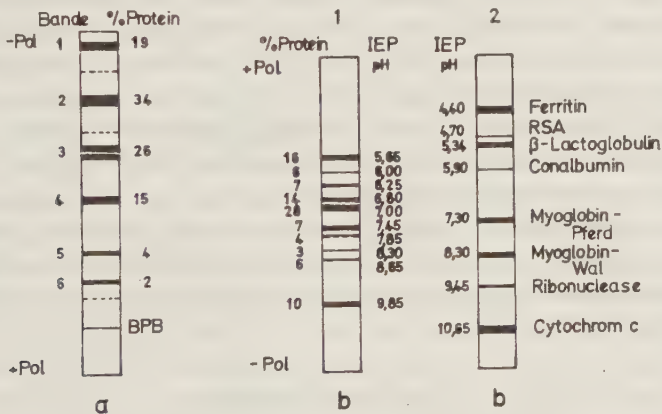


Abb. 13: Elektrophoretische Auftrennung der Proteine des entsalzten IES-haltigen AcA-Peaks des Butanol-Wasserextraktes (= erster P-2 Peak)
a: Disc-Elektrophorese (pH = 8,8), 25 μ l $\hat{=}$ 0,2 mg Protein. Markierung der Banden mit Coomassieblau
b: Isoelektrische Focussierung (pH = 2-11) der Probe (1), 50 μ l $\hat{=}$ 0,3 mg Protein, und der Eichlösung (2). Proteinfixierung und Markierung mit 20 %iger TCA-Lösung

Da sich nach Disc-Elektrophorese und Anfärben der Gele mit schwefelsaurer Fuchsinlösung (spezifisch für Glykoproteine) nur diffuse Banden erkennen ließen, wurde der Zuckeranteil nach saurer Hydrolyse der ersten P-2 Fraktion über PC (zweidimensional) bestimmt. Dabei wurden die Zucker Glucose, Galaktose, Arabinose, Xylose, Mannose und der Alkohol Inosit mit abnehmender Menge gefunden, die alle wiederum für das Vorliegen von Glykoproteinen sprechen (PIGMAN u. HORTON, 1970). Zur Bestimmung der Aminosäuren, aus denen sich die Proteine des 1. Peaks der P-2 Säule zusammensetzen, wurde ebenfalls nach saurer Hydrolyse von 28 mg (= 5,6 mg Protein bei einem Gewichtsanteil von 20,1 % nach Biuret) eine Aminosäuren-Analyse durchgeführt, die die in Tab. 21 (S.90) aufgestellten Molverhältnisse ergab. Die am häufigsten vertretene AS war Glutaminsäure, gefolgt von Methionin, Serin und Asparaginsäure. Daneben wurden vor Asparaginsäure 2 große Peaks, ebenfalls einer zwischen Serin und Glutaminsäure und ein weiterer hoher vor Ammoniak gefunden, die nicht identifiziert werden konnten. Insgesamt ließen sich aber nur geringe Mengen an AS wiederfinden (= 0,163 mg), obwohl doch immerhin 2,8 mg Protein (= korrigierter Wert, Tab. 21) zur Hydrolyse eingesetzt worden waren. Diese geringe Ausbeute an AS läßt sich daher nur erklären, wenn man eine Reaktion der Zucker, die ja in großer Menge vorliegen, mit den AS während der Hydrolyse annimmt. Für das Ablaufen der sog. Maillard-Reaktion (MAILLARD, 1912), wobei die Aminogruppen der AS mit reduzierenden Zuckern im sauren bei Temperaturen bereits von 60-80°C reagieren, spricht die Tatsache, daß bei der zur PC der Zucker durchgeführten sauren Hydrolyse der ersten P-2 Fraktion innerhalb kurzer Zeit eine sehr starke Braunfärbung eintrat. Diese Bräunung ist auf die Bildung von Melanoidinen, die die hochmolekularen Endprodukte der Maillard-Reaktion darstellen, zurückzuführen.

2.3. Vergleich der beiden Wasserextrakte

Um eine Aussage über die nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Karyopsen erhaltenen Wasserextrakte (vgl. 2.1.2.1. und 2.2.1.1.) bezüglich ihrer Zusammensetzung machen zu können, wurden beide anhand ihrer Inhaltsstoffe charakterisiert. Durch deren Vergleich war es möglich festzustellen, ob unterschiedliche oder aber identische IES-Fractionen isoliert wurden.

2.3.1. Vergleich vor Gelfiltration

Bei der Isolierung und Untersuchung des Wasserextraktes nach NaCl-Pufferextraktion (= NaCl-Wasserextrakt) wurde immer von 10 g Karyopsen ausgegangen, während bei der Wasserextraktion nach Entfetten der Karyopsen (= Butanol-Wasserextraktion) eine Ausgangsmenge von 5 g Karyopsen für die weiteren Untersuchungen jeweils ausreichte, da hier weniger Protein und mehr IES isoliert wurde. Daraus folgt, daß im Butanol-Wasserextrakt die gebundene IES gegenüber im NaCl-Wasserextrakt, der im Verhältnis zur IES mehr Fremdprotein enthält, bereits angereichert vorliegt (Tab. 22). Da mittels Vergleich der beiden Rohextrakte noch keine Aussage über eine mögliche Identität der IES-Fractionen gemacht werden konnte, mußten zusätzlich die nach Gelfiltration gewonnenen Ergebnisse einander gegenübergestellt werden.

2.3.2. Vergleich nach Gelfiltration und Entsalzung der IES-haltigen Peak-Fractionen

Bei Gelfiltration über Ultrogel AcA-54 wurde deutlich, daß die Hauptproteinmenge des NaCl-Wasserextraktes ein MG von größer 17000 Daltons besitzt (Abb. 9), während im Butanol-Wasserextrakt die IES-Fraktion mit einem MG von 7000-13500 Daltons den größten Anteil darstellt (Abb. 12). Um zu testen, ob die aus beiden Extrakten mittels Gelfiltration jeweils eluierte IES-Fraktion mit identischem MG und Elutionsprofil auch gleiche Zusammensetzung aufweist, wurden die nach Entsalzung dieser Säulenfraktion durchgeführten Untersuchungen miteinander verglichen. Die mit den beiden ersten P-2 Peaks der Biogelsäule jeweils durchgeführte Disc-Elektrophorese (Abb. 10 und 13a) zeigte im wesentlichen gleiches Proteilmuster, ebenfalls stimmen die IEPs der Hauptproteinbanden nach Focussierung der beiden Extrakte (Abb. 10 und 13b) sehr gut überein.

Die über PC gefundene Menge der Zuckerkomponenten der beiden Fractionen ließ erkennen, daß der Zuckeranteil der ersten P-2 Probe des Butanol-Wasserextraktes wesentlich größer ist. Damit kann auch erklärt werden, weshalb nach AS-Analyse der ersten P-2 Fraktion des NaCl-Wasserextraktes bei einem Einsatz von 0,8 mg Protein (Tab. 21, korrigierter Wert) eine AS-Menge von 0,4 mg wiedergefunden werden konnte, hingegen aber die entsprechende

Fraktion des Butanol-Wasserextraktes bei einem Proteineinsatz von immerhin 2,8 mg (Tab. 21, korrigierter Wert) eine AS-Menge von nur mehr 0,16 mg lieferte. In beiden Fällen beruht diese Diskrepanz vom gefundenen zum tatsächlichen Proteingehalt (ca. 50 % bzw. 94 % Verlust) auf der Maillard-Reaktion, nur werden eben in der Fraktion des Butanol-Wasserextraktes im Vergleich zum NaCl-Wasserextrakt offensichtlich wesentlich mehr AS mit den vorhandenen Zuckern umgesetzt. Dennoch kann aus der molaren Verteilung der AS (Tab. 21), ebenfalls wie aufgrund der über PC identifizierten Zucker gefolgert werden, daß in beiden Extrakten vermutlich Glykoproteine vorliegen, da bei diesen die Hauptkomponenten an AS gewöhnlich Glutaminsäure, Asparaginsäure und Serin darstellen (PIGMAN u. HORTON, 1970).

Tab. 21: Vergleich der Molverhältnisse der nach Hydrolyse der ersten P-2 Fraktion von beiden IES-haltigen Wasserextrakten bestimmten Aminosäuren (Proteinbestimmung mittels Biuret-Methode)

erste P-2 Fraktion des NaCl-Wasserextraktes (Δ 1,6 mg Protein *)		erste P-2 Fraktion des Butanol-Wasserextraktes (Δ 5,6 mg Protein *)	
AS	Mol-Verh. Glu=1	AS	Mol-Verh. Glu=1
Lysin	0,22	Lysin	0,02
Histidin	0,11	Histidin	0,01
Asparaginre.	0,52	Asparaginre.	0,11
Threonin	0,33		
Serin	0,53	Serin	0,20
Glutaminre.	1,00	Glutaminre.	1,00
Glycin	0,98	Glycin	0,02
Alanin	0,58	Alanin	0,06
		Valin	0,03
Methionin	0,39	Methionin	0,28
Isoleucin	0,14		
Leucin	0,34	Leucin	0,05
Tyrosin	0,20		
Phenylalanin	0,10	Phenylalanin	0,01

*Korrekturfaktor: mg Protein x 0,5 = tatsächlicher Proteingehalt (vgl. 3.2.2.1.)

Der entscheidende Unterschied der beiden Extrakte liegt aber - wie von Anfang an - im IES-Gehalt. Im Rohextrakt lagen beim NaCl-Wasserextrakt nur 128 μ g IES/100 g Körner vor gegenüber dem Butanol-Wasserextrakt mit einem IES-Gehalt von 310 μ g/100 g Körner. Allerdings handelt es sich hierbei - wie erst später nachgewiesen wurde (vgl. 3.1.2.) - um 2 unterschiedliche IES-Verbindungen (III + II, Schema 6), die im Verhältnis 1:1 im Rohextrakt vorliegen und die erst über Biogel P-2 voneinander getrennt werden. Nach Gelfiltration über AcA-54 wird in der erhaltenen IES-Fraktion ausgehend vom Butanol-Wasserextrakt die IES quantitativ wiedergefunden, während der NaCl-Wasserextrakt nur unter großem IES-Verlust aufgetrennt werden konnte (Tab. 22). In den nach Entsalzung der jeweiligen IES-haltigen AcA-Eluat vorliegenden Proteinfraktionen, die aufgrund von Disc-Elektrophorese und Focussierung zwar in etwa gleiches Proteilmuster, aber nach PC unterschiedliche Zuckermengen aufweisen, wurde nur ausgehend vom Butanol-Wasserextrakt in der ersten P-2 Fraktion gebundene IES (Verbindung III) gefunden. Aufgrund des Salzgehaltes des NaCl-Wasserextraktes wurde auf der Biogel P-2 Säule mit abnehmender NaCl-Konzentration die IES freigesetzt und deshalb im ersten P-2 Peak fast keine IES (Verbindung III) mehr nachgewiesen (Tab. 22).

Die nach der Entsalzung der 3. AcA-Fraktion über Biogel P-2 im Salzpeak (= zweiter P-2 Peak) vorliegende IES-Verbindung (II, Schema 6) läßt sich nur im Butanol-H₂O-Extrakt finden (vgl. 3.1.2.), nicht im NaCl-Wasserextrakt, dessen zweiter P-2 Peak keine IES aufweist.

Zwar wird mit den beiden unterschiedlichen Extraktionen vermutlich dieselbe wasserlösliche IES-haltige Fraktion isoliert, aber wegen der höheren IES-Ausbeute und vor allem wegen der größeren Stabilität der gebundenen IES im Butanol-Wasserextrakt empfiehlt es sich, diesen dem NaCl-Wasserextrakt vorzuziehen.

Mit der successiven Wasserextraktion nach Entfetten der Karyopsen mit n-Butanol war hiermit eine Extraktionsmethode gefunden, mit der sich relativ leicht eine gebundene IES-haltige Fraktion gewinnen ließ, die sich vor allem auch relativ stabil verhielt bei den bisher folgenden Aufarbeitungs- und Anreicherungs-schritten.

Tab. 22: Vergleich der beiden IES-haltigen Wasserextrakte vor und während der Auftrennung bezüglich ihrer Inhaltsstoffe (Proteingehalt nach Biuretbestimmung korrigiert mit Faktor 0,5, vgl. 3.2.2.1.)

	NaCl-Wasserextrakt aus 10 g Karyopsen	Butanol-Wasserextrakt aus 5 g Karyopsen
Rohextrakt		
Gewicht (mg)	710	450
geb. IES (mg)	0,017	0,021
Protein (mg)	21,3 (= 3 %)	9,7 (= 2,2 %)
IES : Protein (Mol : mg)	1 : 218 800	1 : 80 900
3. AcA-Peak		
Gewicht (mg)	850	770
MG	8000 - 14000	7000 - 13500
geb. IES(mg)	0,005	0,019 (+ 0,002 im 4. Peak)
Protein (mg)	2,5 (= 0,3 %)	4,4 (= 0,6 %)
IES : Protein (Mol : mg)	1 : 83 400	1 : 41 000
erste P-2 Peak (= entsalzter 3. AcA Peak)		
geb. IES (mg)	sehr geringe Spuren	0,008*
Protein (mg)	2,0	1,9
IES : Protein (Mol : mg)		1 : 41 000
Zucker	Glucose, Galaktose Xylose, Rhamnose	Glucose, Galaktose, Arabinose, Xylose, Mannose, Inosit

* IES-Bestimmung s. 3.1.1.

3. Auftrennung des wasserlöslichen IES-haltigen Rohextraktes aus Haferkaryopsen mit Untersuchungen der einzelnen Fraktionen zur Identifizierung ihrer Inhaltsstoffe

Da aus dem nach Entfetten der Karyopsen mit n-Butanol gewonnenen, IES-haltigen Wasserextrakt eine IES-Verbindung angereichert und isoliert werden sollte, mußte dieser Rohextrakt so schonend aufgetrennt werden, daß die IES möglichst nicht zerstört oder abgespalten wurde. Deshalb war es notwendig, nach jedem Trennungsschritt als erstes mit den Fraktionen eine IES-Bestimmung durchzuführen. Um nähere Angaben über die Inhaltsstoffe der jeweiligen aufgetrennten IES-Fractionen zu erhalten, wurden damit verschiedene Untersuchungen durchgeführt, da sich oftmals erst aus den daraus resultierenden Ergebnissen die weiteren Reinigungsschritte ergaben.

3.1. Reinigung der gebundenen IES des Wasserextraktes

Mit Hilfe successiver Auftrennungsschritte sollte es möglich sein, aus dem Wasserextrakt die gebundene IES zumindest in einer angereicherten Fraktion zu erhalten, deren genaue Charakterisierung sodann ohne große Schwierigkeit gelingen sollte. Aufgrund des besseren Überblicks sind im folgenden zunächst einmal nur die einzelnen Reinigungsschritte nacheinander aufgeführt (vgl. 3.1.11., Schema 5, Seite 121).

3.1.1. Entsalzen der phosphathaltigen IES-Säulenfraktion nach Gelfiltration des Rohextraktes über Ultrogel AcA 54

Aus den unter 2.2.2. beschriebenen Versuchen ist bereits bekannt, daß nach der Auftrennung des Rohextraktes über die Ultrogel AcA 54-Säule die IES im 3. Säulenpeak zu 90 % vorlag. Beim Entsalzen dieser IES-haltigen Fraktion über Biogel P-2 mit bidest. Wasser mußte dann allerdings ein insgesamt 49 %iger Verlust an IES hingenommen werden, wobei sich die gebundene IES auf zwei Peakeluate verteilte (1. Peak: 27 % IES, 2. Peak: 24 % IES der aufgetragenen Menge). Um eine möglicherweise stattfindende Abspaltung einer niedermolekularen IES-Verbindung (2. Peak) von der höhermolekularen Ausgangsverbindung (1. Peak) zu verhindern, wurde versucht, die gebundene IES während der Entsalzung zu stabilisieren.

Da Hydrochinon offensichtlich auf gelöste IES-Fractionen einen stabilisierenden Einfluß ausübt (vgl. 2.1.2.2.), wurde das IES-haltige Lyophilisat der AcA-Säule statt in bidest. Wasser in $10^{-4}M$ Hydrochinonlösung gelöst und anschließend wieder über die Biogel P-2 Säule (5/20 cm) mit bidest. Wasser entsalzt. Diesmal betrug die IES-Ausbeute im 1. salzfreien Peak 43 % (Δ 120 μg IES/100 g Körner) und im 2. phosphathaltigen Peak 45 % (Δ 126 μg IES/100 g Körner), wobei die IES immer in der gebundenen Form vorlag. Der 3. Peak, mit dem das Hydrochinon von der Säule eluiert wurde, war völlig frei von IES. Da durch Zusatz von Hydrochinon beim Auflösen des lyophilisierten Extraktes der IES-Wiederfund von 51 % auf 88 % angestiegen war, wurde diese Substanz ab jetzt allen IES-haltigen Proben bei Lösungsvorgängen zugesetzt. Dennoch lag die gebundene IES ebenfalls wieder in zwei Peakeluat en vor. Da sich hiermit die Frage ergab, ob aufgrund einer schlechten Trennung die IES-Verbindung vom 1. Peak eventuell mit in den 2. Peak hinüber "schmierte", in dem neben Phosphat zudem auch Protein nachgewiesen werden konnte (vgl. 2.2.2.), mußte zu deren Klärung nach anderen Methoden gesucht werden, die IES-haltige AcA-Säulenfraktion zu entsalzen.

Nach den bisherigen Ergebnissen schien die Dialyse dafür sehr ungeeignet, da der IES-Verlust nach den langen notwendigen Dialysezeiten immer sehr hoch war, d.h. meist nur mehr Spuren der eingesetzten IES gefunden wurden (vgl. 2.1.1.1. und 2.1.1.2.). Mit der Ultrafiltrationsmethode, die zwar den Vorteil hat, daß das phosphathaltige Säuleneluat direkt unter Konzentrierung über einen Filter entsprechender Porengröße gegeben werden kann, wurde aber auch kein besseres Ergebnis erzielt, da bei einer Porendurchlässigkeit bis zu einem Molekulargewicht von 500 oder auch 1000 Daltons die Filtrationszeiten selbst bei sehr hohem Druck für das AcA-Säuleneluat (= 360 ml) mit ca. 3 ml/h ebenfalls zu lange waren.

Deshalb wurde jetzt nach einem anderen Auftrennungsverfahren des Rohextraktes gesucht, um die Frage klären zu können, ob eine oder aber bereits zwei verschiedene IES-Verbindungen im Wasserrohextrakt vorliegen.

3.1.2. Auftrennung der Extrakte vor und nach Gelfiltration mittels DC

Als Auftrennungsmethode bot sich die DC an, da die IES-Fraktion mit einem MG nach Eichung der AcA-Säule (vgl. Abb. 12) von 7000 - 13500 Daltons dafür gerade noch geeignet schien. PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) konnten nämlich sogar IES-Ester mit einem angeblichen MG von 5000 bis 20000 Daltons über DC reinigen.

3.1.2.1. Chromatographie des Rohextraktes

Für die DC wurde der ebenfalls in 10^{-4} M Hydrochinonlösung gelöste Rohextrakte zunächst in der UZ klarzentrifugiert (vgl. 2.2.2.). Da sich der lyophilisierte Überstand in organischen Lösungsmitteln nicht lösen ließ, sondern nur in Wasser völlig löslich war, wurde dieser zum Auftragen auf die DC-Platten in Wasser/Acetongemisch (1:1) in Lösung gebracht. Auf Alufolie mit Kieselgel GF konnte die IES-Fraktion aber in keinem der sechs getesteten Fließmittel (I-VI, vgl. 6.4.) zum Laufen gebracht werden, d.h. mit van Urk ergab immer nur der Startfleck eine positive IES-Farbreaktion. Freie IES wurde dabei - in Übereinstimmung mit der IES-Bestimmung nach Ätherextraktion - nie gefunden. Erst in Fließmittel VII (vgl. 6.4.) trennte sich eine IES-Verbindung II (Schema 6) mit relativ hohem R_f -Wert = 0,76 vom Startfleck ab, der sich aber ebenfalls mit van Urk wieder blau färbte (IES-Verbindung III), und diese war nicht identisch mit IES (R_f = 0,97), Tryptophan (R_f = 0,88), Indolyl-acetamid (R_f = 1) und IES-Methylester (R_f = 0,93). Sowohl mit Ninhydrin als auch mit Anilin-Diphenylamin ergab dieser Fleck, ebenso wie der Startpunkt, jeweils eine positive Farbreaktion. Auch PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) fanden nach DC im selben Fließmittel (VII, vgl. 6.4.) ihrer über Ionenaustauscher und Sephadex G 50 gereinigten IES-Esterfraktion aus Hafermehl bei einem R_f -Wert von 0,75 bis 0,90 eine IES-enhaltende Zone, die ebenfalls mit Anthron- und Ninhydrin-positivem Material cochromatographierte.

Da aber in diesem Fließmittel auf Alufolie bei der Chromatographie des Rohextraktes ein sich verfärbender Untergrund über die Platte "schmierte", und sich deshalb keine scharfen Zonen bildeten, wurden weitere Fließmittel getestet (VIIa, VIII und IX, vgl. 6.4.), wobei aber jedesmal oberhalb R_f = 0,70 zusätzlich ein IES-positiver Fleck identifiziert werden konnte. Das beste Resultat lieferte die Chromatographie auf selbstgestrichenen Kieselgel G-Platten

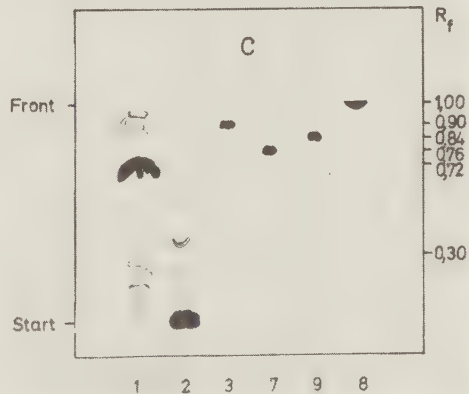
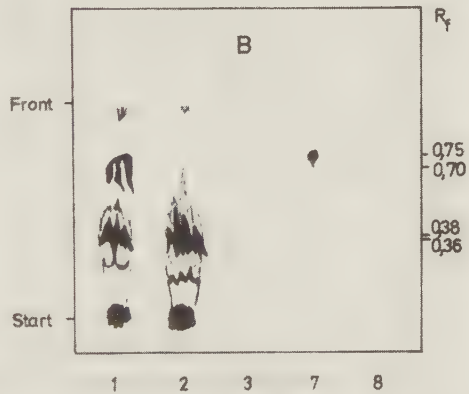
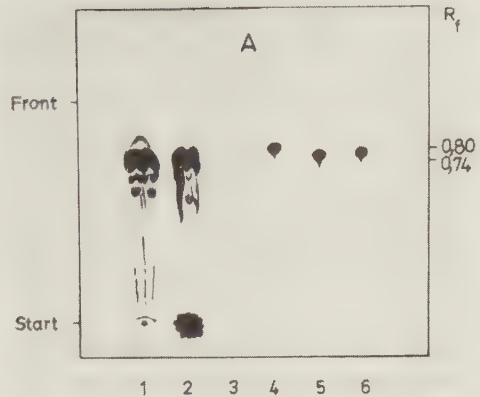
mit Fließmittel IX (vgl. 6.4.). Zudem konnten jetzt die beiden IES-Verbindungen III + II (Schema 6) aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit bereits vor dem Auftragen auf die DC-Platte quantitativ getrennt werden. Während sich nur die IES-Verbindung II (R_f -Wert von 0,69-0,72) in einer Mischung aus Tetra/Äthanol/Wasser (12:35:8) völlig löste, ging die IES-Verbindung III, die wiederum am Start sitzen blieb, erst mit dest. Wasser in Lösung. Auch in diesem DC-System war die "gelaufene" IES-Verbindung II nicht identisch mit freier IES (R_f = 0,90), Tryptophan (R_f = 0,76), IES-Methyl- (R_f = 1) und IES-Serylester (R_f = 0,84), die alle wiederum einen höheren R_f -Wert aufwiesen. Beide IES-Verbindungen III und II zeigten aber eine sowohl Ninhydrin- als auch Anilin-Diphenylamin-positive Reaktion (Abb. 14). Aufgrund dieser beiden DC-Trennungen (Fließmittel VII u. IX, vgl. 6.4.) können so zwei verschiedene IES-haltige Verbindungen II und III bereits im Rohextrakt sicher nachgewiesen werden.

Da die IES-Verbindung II (R_f = 0,71) nach DC eine Ninhydrin-positive Reaktion zeigte (vgl. Abb. 14 B und C), schien es interessant, verschiedene AS und auch Peptide ebenfalls auf Kieselgel G in Fließmittel IX (vgl. 6.4.) zum Vergleich der R_f -Werte zu chromatographieren. Während die getesteten Peptide offensichtlich nach ihren Molekulargewichten auftrennten (Tab. 23), wobei die Grenze bei einem MG von 3500 Daltons zu liegen scheint, ließen sich die AS im R_f -Bereich von 0,26 (Lysin) bis 0,76 (Tryptophan) finden (Tab. 23). Vergleicht man nun den R_f -Wert von Serin (= 0,47) mit dem vom IES-Serylester (R_f = 0,84), wobei zu bemerken ist, daß die IES in diesem Fließmittel einen R_f -Wert von 0,90 aufweist, so kann daraus gefolgert werden, daß die IES-Verbindung II mit einem R_f -Wert von 0,71 durchaus mit einem kurzen Peptid verknüpft sein könnte. Dieser Befund würde mit der Tatsache übereinstimmen, daß PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) IES-Ester, die offensichtlich gleiches chromatographisches Verhalten zeigen (DC, Fließmittel VII, vgl. 6.4.) wie die IES-Verbindung II, an Ionenaustauscher binden und bei verändertem pH wieder eluieren konnten.

Abb. 14: DC-Chromatographie des wäßrigen Rohextraktes aus Haferkaryopsen auf Kieselgel G in Fließmittel IX (vgl. 6.4.); Nachweis der Zucker mit Anilindiphenylamin (A), der Aminosäuren und Peptide mit Ninhydrin (B) und der IES mit van Urk (C)

- 1: Rohextrakt, erst gelöst in Fließmittel (ohne Aceton)
- 2: Rohextrakt, danach Rest gelöst in dest. Wasser
- 3: IES
- 4: Glucose
- 5: Ribose
- 6: Mannose
- 7: Tryptophan
- 8: IES-Methylester
- 9: IES-Serylester

- : dunkle Flecken, jeweils positive Farbreaktion auf Sprühreagenz
- : helle Flecken, anderweitige Farbreaktionen



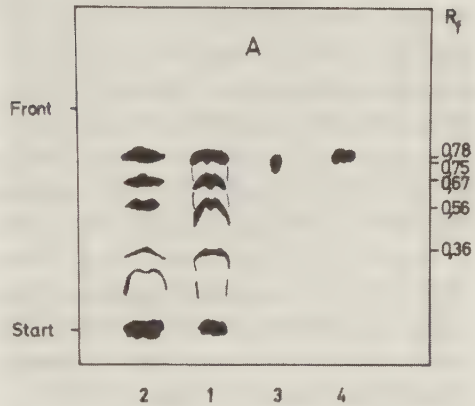
Tab. 23: R_f -Werte verschiedener Aminosäuren und Peptide nach DC (Kieselgel G, Fließmittel IX: vgl. 6.4., Farb-reaktion mit Ninhydrin) im Vergleich zu R_f -Werten von IES und IES-Verbindungen

AS + Peptide	R_f -Wert	Vergleich	R_f -Wert
		IES	0,90
Tryptophan	0,76		
Phenylalanin	0,75		
Methionin	0,71		
Leucin	0,68		
Valin	0,61		
Threonin	0,52		
Serin	0,47	IES-Serylester	0,84
Arginin	0,46		
Prolin	0,41		
Asparaginre.	0,32		
Insulin A (MG = 2532)	0,29		
Histidin	0,28		
Lysin	0,26		
Insulin B (MG = 3495)	0,05		
		IES-Verbindung II	0,71

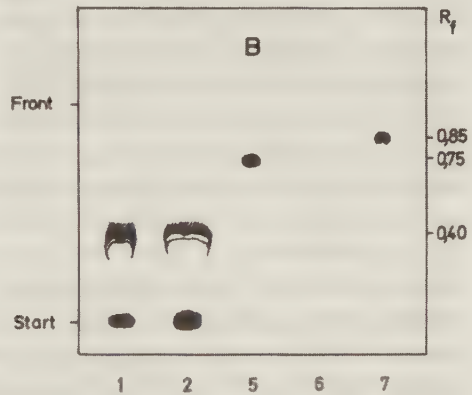
3.1.2.2. Chromatographie der Biogel P-2 Säulenfraktionen

Die nächste Frage war nun, wie sich die beiden über DC identifizierten IES-Verbindungen II und III nach der Gelfiltration des Rohextraktes und Entsalzung der IES-haltigen 3. AcA-Säulenfraktion auf die von der Biogel P-2 Säule eluierten Peaks verteilten. Um dies festzustellen, wurde sowohl der 1. IES-haltige, salzfreie Peak als auch der 2. IES-haltige Salzpeak nach der Gefriertrocknung zunächst in einer Mischung aus Tetra/Äthanol/Wasser (12:35:8) gelöst und der ausgefallene Rest anschließend mit bidest. Wasser in Lösung gebracht. Beide Fraktionen wurden nach DC-Entwicklung (Kieselgel G, Fließmittel IX: vgl. 6.4.) sowohl auf IES (van Urk) als auch Aminosäuren und Peptide (Ninhydrin) und Zucker (Anilin-Diphenylamin) getestet (Abb. 15).

Abb. 15: DC-Chromatographie der ersten P-2 Fraktion auf Kieselgel G in Fließmittel IX (vgl. 6.4.); Nachweis der Zucker mit Anilin-Diphenylamin (A), der Aminosäuren und Peptide mit Ninhydrin (B) und der IES mit van Urk (C)

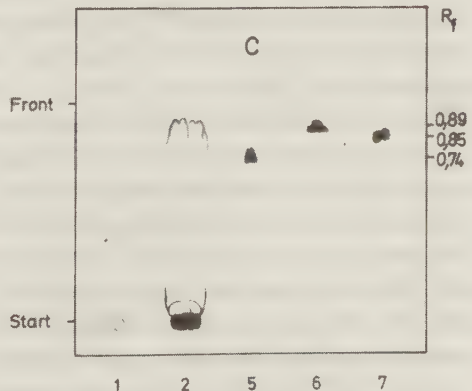


- 1: erste P-2 Fraktion, erst gelöst in Fließmittel (ohne Aceton)
2: erste P-2 Fraktion, danach Rest gelöst in dest. Wasser



- 3: Mannose
4: Glucose
5: Tryptophan
6: IES
7: IES-Seryllester

- : dunkle Flecken, jeweils positive Farb-reaktion auf Sprüh-reagenz
○: helle Flecken, ander-weitige Farbreaktionen



Wie erwartet, wurde die IES-Verbindung II ($R_f = 0,71$) nur in der zweiten P-2 Fraktion (= salzhaltig) gefunden und zwar wiederum nur in dem Anteil, der sich im Tetra/Äthanol/Wassergemisch (12:35:8) gut lösen ließ. Da das Salz dabei ausfiel und nicht in Lösung gegangen war, konnte dieser Teil der zweiten P-2 Fraktion sehr gut chromatographiert und die IES-haltige Verbindung II eindeutig identifiziert werden, die auch hier wiederum sowohl eine Ninhydrin- als auch Anilin-Diphenylamin-positive Reaktion aufwies. Wesentlich schlechter dagegen ließ sich der restliche, nur wasserlösliche Teil des zweiten P-2 Peaks chromatographieren, da sehr viel Salz mit in Lösung ging. Dennoch konnte auch hier am Start eine, allerdings schwache Blaufärbung nach van Urk Reaktion erkannt werden. Die weitaus größere Menge dieser IES-Verbindung III, die im verwendeten Fließmittel IX (vgl. 6.4.) am Start sitzen bleibt, wurde nach DC des ersten P-2 Peaks im nur wasserlöslichen Teil der Fraktion gefunden. In dem im Fließmittel gelösten Anteil trat hier hingegen nach DC mit van Urk über die ganze Laufstrecke hinweg keine Blaufärbung auf (Abb. 15).

Da sich der Startfleck nach DC der wasserlöslichen ersten P-2 Fraktion sowohl mit van Urk als auch ebenfalls wieder mit Ninhydrin und Anilin-Diphenylamin anfärbte (Abb. 15), wurde versucht, mittels zweidimensionaler Chromatographie diesen Startfleck weiter aufzutrennen (1. Richtung: Fließmittel IX, 2. Richtung: bidest. Wasser). Nach Ansprühen mit van Urk, Ninhydrin und Anilin-Diphenylamin wurde aber sichtbar, daß sich außer Zucker keine andere Substanz vom Start abgetrennt hatte, während die bereits in Fließmittel IX (vgl. 6.4.) (1. Richtung) gewanderten Substanzen alle auch in der nächsten Richtung nochmals liefen. Nach wie vor färbte sich der Startfleck sowohl mit van Urk als auch mit Ninhydrin und Anilin-Diphenylamin sehr gut an.

Anhand der DC war somit gezeigt, daß die im Rohextrakt vorliegenden beiden IES-haltigen Verbindungen II und III nach der Entsalzung der 3. AcA-Fraktion über Biogel P-2 fast quantitativ in den 1. und 2. Peak aufgetrennt werden. Im 1. Peak liegt nur die wasserlösliche (= Verbindung III), im 2. Peak kommt neben einer kleinen Menge dieser wasserlöslichen die gesamte im Fließmittel lösliche IES-Verbindung II vor. Da sich die Verteilung der IES auf die beiden Peaks anhand der quantitativen IES-Bestimmung nach Ätherextraktion und DC mit 1:1,05 errechnen läßt (vgl. 3.1.1.), folgt daraus, daß diese beiden Verbindungen II und III etwa in gleicher Menge im Rohextrakt vorliegen müssen.

3.1.3. Präparative Säulenelektrophorese der ersten P-2 Fraktion mit GC-Untersuchungen der eluierten Banden

Nachdem nun sicher feststand, daß über Biogel P-2 die beiden IES-haltigen Verbindungen II und III des Rohextraktes voneinander getrennt wurden, sollte die erste P-2 Fraktion (IES-Verbindung III) weiter aufgereinigt werden. Mit dieser Fraktion schien die weitere Auftrennung problemloser zu sein, da diese im Gegensatz zur zweiten P-2 Fraktion (IES-Verbindung II) vor allem salzfrei vorlag und sich die darin enthaltene wasserlösliche IES-Verbindung III durch ein höheres MG auszeichnen muß.

Mit Hilfe analytischer Elektrophoresen konnten bislang immer saubere und exakte Trennungen erreicht werden (Focussierung, Disc-Elektrophorese, Abb. 13a, b). Deshalb schien die weitere Aufreinigung der IES-haltigen ersten P-2 Fraktion (Verbindung III) über eine präparative Elektrophorese durchaus Erfolg zu versprechen. Zur Überprüfung dieser präparativen Trennung konnten mit den eluierten Banden anschließend analytische Untersuchungen durchgeführt werden. Eine Flachbettfocussierung auf Biogel P-200 (pH-Bereich: 4-9) ergab aber im präparativen Maßstab keine gute Trennung, wie sich aufgrund der analytischen Überprüfung der eluierten Zonen mittels nochmaliger Focussierung (pH = 2-11) herausstellte.

Von der Disc-Elektrophorese (pH = 8,8; Abb. 13a) hingegen war bereits bekannt, daß die erste P-2 Fraktion dabei in 4 Hauptbanden aufspaltet, wobei die gebundene IES aufgrund des mittels Gelfiltration über Sephadex G 50 (vgl. Abb. 17) abgetrennten IES-haltigen Peaks mit einem Anteil von 55 % der Gesamtproteinmenge entweder in der 2. oder 3. Hauptbande (zusammen 60 % Protein) vermutet wurde. Deshalb sollte es mit Hilfe einer adäquaten elektrophoretischen Trennung im präparativen Maßstab gelingen, möglicherweise eine IES-haltige Bande zu isolieren und zu untersuchen. Bei der Säulenelektrophorese war es möglich, die gesamte in 2 ml 20 mM Tris-HCl pH = 7,5/5 mM DTT gelöste Probe (erste P-2 Fraktion $\hat{=}$ 5 g Karyopsen), die mit Saccharose und Bromphenolblau versetzt war, auf das obere Ringgel (= 2,9 cm) aufzutragen. Während des Elektrophoreselaufes durchwanderten nun die Proteine unter Auftrennung das Ringgel und gelangten anschließend in den sich darunter befindlichen Zuckergradienten, in dem sich die getrennten

Proteinbanden stabil verhalten. Nachdem die Bromphenolblaubande als scharfe, enge Zone 8,8 cm weit in dem Saccharosegradienten gewandert war (Dauer: 1,5 Tage), konnte angenommen werden, daß die meisten Proteinbanden ebenfalls bereits im Gradienten vorliegen müßten. Von der anschließend über eine Injektionsnadel abgesaugten Zuckerlösung wurde die Extinktion bei 254 nm mittels einer Durchflußküvette gemessen. Erstaunlicherweise erschien bereits kurz vor der Bromphenolblaubande ein über die Extinktion aufgezeichneter Peak (= 15,5 ml). Die Bromphenolblaubande selbst wurde gemeinsam mit Protein eluiert (= 15,5 ml) und dahinter folgten noch 2 weitere voneinander abgetrennte Peaks, wovon der letzte (Peak 2: 11,5 ml) eine höhere Extinktion bei 254 nm aufwies als der erste (Peak 1: 12,5 ml). Nach Anfärben des Ringgels mit Coomassieblau wurden hier ebenfalls noch 2 Proteinbanden sichtbar, die offensichtlich noch nicht in den Rohrzuckerbereich eingewandert waren.

Um nun die einzelnen eluierten Zonen auf IES zu testen, wurde die zuvor anhand der ersten P-2 Fraktion ausgearbeitete GC-Methode (vgl. 1.3.2.) angewandt. Nach Hydrolyse, Ätherextraktion der freigesetzten IES und anschließender Methylierung wurden die einzelnen Proben direkt im GC getestet. Sowohl in der Probe der Bromphenolblaubande als auch des 1. und 2. Peaks wurde eindeutig der IES-Methylester anhand der Retentionszeit und der schulterfreien Peakvergrößerung bei Zugabe des Standards identifiziert. Um aber ganz sicher zu gehen, auch wirklich einen IES-Methylesterpeak vorliegen zu haben und nicht irgendeine Verunreinigung, wurden die methylierten Proben, die im GC relativ viele und im Vergleich zum IES-Esterpeak höhere Signale ergaben, über DC auf Aluplatten mit Kieselgel Si (vgl. 1.3.3.1.) vorgereinigt. Die von der DC eluierten Esterzonen der Proben, die anschließend wieder im GC geprüft wurden, ergaben aber wiederum alle eindeutig einen IES-Methylesterpeak.

Dieses Ergebnis konnte nicht anders gedeutet werden, als daß eine Abspaltung der IES während der Elektrophoresedauer stattgefunden haben muß und diese freigesetzte IES nun über den Bereich des Zuckergradienten hinwegschmiert. Damit erwies sich aber die präparative Säulenelektrophorese zur Auftrennung der IES-haltigen Fraktion als höchst ungeeignet.

3.1.4. Bindungsversuche der ersten P-2 Fraktion an Concanavalin A-Sepharose

Da das Vorkommen von Glykoproteinen in der ersten P-2 Fraktion eindeutig nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.2.2.3.), ergab sich damit für die IES-haltige Verbindung III möglicherweise eine weitere Auftrennungsmethode. Mehrere Autoren (ASPERBERG u. PORATH, 1970; KENNEDY u. ROSEVEAR, 1973; KRUSIUS, 1976) beschreiben eine vollständige Abtrennung der Proteine von sowohl Kohlenhydraten als auch Glykoproteinen durch Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose, wobei die gebundenen zuckerhaltigen Substanzen mittels kompetitiver Bindung von α -D-Glucose oder Mannose wieder eluiert werden können. Deshalb wurde jetzt versucht, die erste P-2 Fraktion ebenfalls über Con A-Sepharose weiter aufzutrennen.

Anhand eines Testlaufes mit Ovalbumin (90 % rein) wurden zunächst die Bedingungen für eine größtmögliche Bindung an die Con A-Sepharose Säule ermittelt, wobei maximal 2/3 der aufgetragenen Menge an der Säule hängen blieben und mit 0,1 M α -D-Glucose im Puffer (10^{-2} M NaAcetat pH = 6,2/5 mM NaCl/1 mM CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2) wieder eluiert werden konnten. Mit denselben Bedingungen wurde aber bei der ersten P-2 Fraktion nur eine Bindung von ca. 2 % der aufgetragenen Menge (ermittelt über E = 280 nm) bei einem insgesamt 77 %igen Wiederfund festgestellt. Auch veränderte Molaritäten sowohl des Puffers als auch des NaCl- und Glucosegehaltes brachten keine besseren Ergebnisse. Dennoch sollte sowohl die nichtgebundene (1. Peak Con A) als auch die gebundene Säulenfraktion (2. Peak Con A) mittels Disc-Elektrophorese überprüft werden.

Wie anhand der Coomassieblau-Färbung der Proteinbanden nach Disc-Elektrophorese deutlich wurde, zeigte die nicht an Con A gebundene Säulenfraktion das identische Bandenmuster der ersten P-2 Fraktion (Abb. 13a). Obwohl auch im 2. Con A-Peak (= gebundene Fraktion) alle Proteinbanden, die nach Disc-Elektrophorese des 1. Con A-Peaks (Abb. 13a) auftrennten, ebenfalls nur in wesentlich geringerer Menge gefunden wurden, was aber mit einer unvollständigen Abtrennung der beiden Peaks voneinander erklärt werden kann, binden wahrscheinlich an die Con A-Säule im Gegensatz zu den Glykoproteinen im wesentlichen nur die in der ersten P-2 Fraktion vorliegenden Kohlenhydrate (vgl. Abb. 15).

3.1.5. Gelfiltration der ersten P-2 Fraktion über Biogel P-10

Da sich also eine Abtrennung der IES-Verbindung III aus der ersten P-2 Fraktion sowohl aufgrund präparativer elektrophoretischer Trennung als auch mittels Affinitätschromatographie nicht durchführen ließ, mußte wieder auf die Gelfiltrationsmethode zurückgegriffen werden. Diesmal wurde aber zur Trennung Biogel P-10 gewählt, dessen Fraktionierungsbereich von 1500 bis 20000 Daltons reicht und damit enger ist als sowohl der des AcA- als auch Sephadex G 50 Gels (vgl. 2.1.2.3.).

Eine mit Biogel P-10 gefüllte 45 cm lange Säule brachte aber keine befriedigende Auftrennung der ersten P-2 Fraktion. Erst bei einer Länge von 75 cm trennten sich 3 Peakfraktionen voneinander, wobei das Elutionsdiagramm dieser Biogel P-10 Säule sowohl von der Peakverteilung als auch vom Verhältnis der Peakflächen zueinander dem der AcA-Säule (Abb. 12) sehr ähnelte. In der 1., aber auch in der 3. Peakfraktion der P-10-Säule (Abb. 20, S. 135) ließ sich keine IES nachweisen. Nur im 2. gelbgefärbten Peak (= Hauptpeak) wurde gebundene, aber keine freie IES gefunden und die IES-Menge nach Hydrolyse über die DC-Methode mit $85 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ Körner bestimmt (Abb. 20), was einem Wiederfund der aufgetragenen Menge von 71 % entspricht.

3.1.6. Entsalzen der IES-haltigen Biogel P-10 Säulenfraktion über Biogel P-2

Für alle weiteren Auftrennungen, sowie analytischen Untersuchungen war es als nächstes notwendig, die IES-haltige, lyophilisierte P-10 Säulenfraktion zu entsalzen. Dazu diente wiederum eine Biogel P-2 Säule (2,4/70 cm). Im Gegensatz zur ersten P-10 Fraktion (nicht IES-haltig), ließ sich aber die Entsalzung der IES-haltigen zweiten P-10 Fraktion (Verbindung III) über Biogel P-2 (Ausschluß: 1800 Daltons) mit bidest. Wasser nur unvollständig durchführen. Da aber sowohl zur Proteinbestimmung als auch Zuckeranalyse (3.2.4.) und DC (3.1.6.2.) immer nur der salzfreie Anteil der zweiten P-10 Fraktion verwendet werden kann, mußten zunächst alle Biogel P-2 Säuleneluate auf ihren IES-Gehalt quantitativ überprüft werden.

3.1.6.1. IES-Bestimmung der Biogel P-2 Peakfraktionen

Bei der Entsalzung der IES-haltigen P-10 Fraktion (Verbindung III) wurden von der Biogel P-2 Säule (2,4/70 cm) insgesamt 3 Peaks eluiert, wovon nur der erste salzfrei war. In diesem salzfreien Peak konnte eine Menge von 32 μg IES/100 g Körner gefunden werden, was nur 38 % der in der pufferhaltigen zweiten P-10 Säulenfraktion vorliegenden IES-Menge entspricht (vgl. 3.1.5.). In den beiden phosphathaltigen nachfolgenden Peaks der Biogel P-2 Säule wurde hingegen noch eine Menge von 40 μg IES/100 g Körner ermittelt, womit der IES-Wiederfund insgesamt auf 85 % - bezogen auf die aufgetragene Menge - ansteigt. Die IES lag dabei immer gebunden vor, freie IES konnte in keinem Peak nachgewiesen werden. Auch diese Entsalzung wurde übrigens mit Zusatz von Hydrochinon (10^{-4}M) durchgeführt (vgl. 3.1.1.). Aufgrund des Hinweises, der vom Hersteller des Biogel P-2 gegeben wird, daß mit deionisiertem Wasser als Elutionsmittel durchaus Abweichungen vor allem bei aromatischen und basischen Proben vom log des MG bezüglich der linearen Abhängigkeit des Elutionsvolumens beobachtet werden können und besonders wegen des relativ niederen MG der zweiten P-10 Fraktion ($\text{MG} < 2000$, vgl. 3.2.5.1.), bei einem Ausschlußpeak des P-2 Gels von 1800 Daltons kann erklärt werden, weshalb sich die Puffersalze nicht mehr vollständig von der IES-Verbindung III abtrennen lassen, was aber leider einen 48 %igen Verlust beim Entsalzen der zweiten P-10 Fraktion über Biogel P-2 zur Folge hat. Das Sephadex G 10 Gel hat zwar seinen Ausschlußpeak bei 700 Daltons, da es aber aufgrund seiner Carboxylgruppen bereits bei geringer Ionenstärke in hohem Maße Wechselwirkungen zwischen geladenen und aromatischen Substanzen und der Matrix aufweist, ist es zum Entsalzen der zweiten P-10 Fraktion noch ungeeigneter. Nach WILLIAMS (1972) zeigen z.B. sowohl Peptide als auch heterocyclische und homocyclische aromatische Verbindungen starke Abweichungen vom üblichen Elutionsverhalten, d.h. sie werden verspätet vom Sephadex G 10 Gel eluiert. Bei der Entsalzung der niedermolekular gebundenen IES (Verbindung III) über Biogel P-2 muß aber zudem das Mengenverhältnis IES:Puffersalzen einen ganz entscheidenden Einfluß auf die Abtrennung der gebundenen IES vom Phosphat ausüben, da sich diese IES-Verbindung III ($\text{MG} < 2000$, vgl. 3.2.5.1.) bei der Entsalzung

der 3. AcA-Säulenfraktion über P-2, die im Vergleich zur zweiten P-10 Fraktion eine geringere Salzkonzentration (AcA-Puffer: $10^{-2}M$) bei einer größeren IES-Menge ($280 \mu g/100 g$ Körner) aufweist, fast 100 %ig im salzfreien ersten P-2 Peak wiederfinden läßt und nur geringe Spuren davon im Salzpeak vorliegen (vgl. 3.1.2.2.). Der zweite P-10 Peak dagegen enthält mehr Puffersalze (P-10 Puffer: $5 \times 10^{-2}M$) und eine geringere Menge an gebundener IES ($85 \mu g$ IES/100 g Körner), was bei seiner Entsalzung über Biogel P-2 zu einer 4:5 Aufteilung der niedermolekular gebundenen IES (Verbindung III) in eine salzfreie und salzhaltige Fraktion führt.

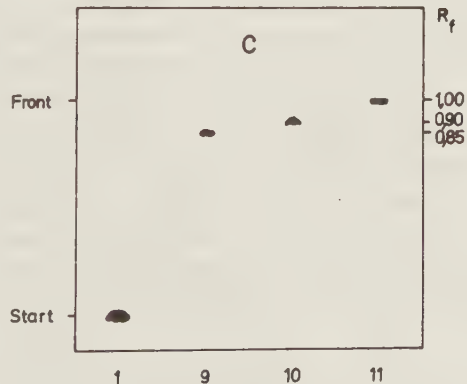
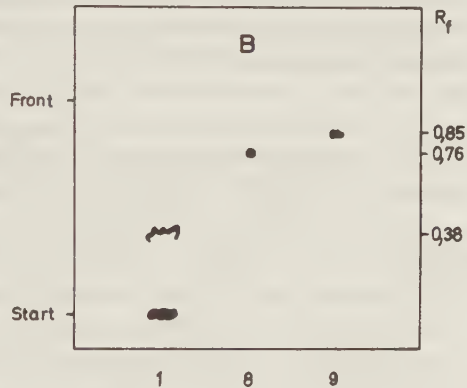
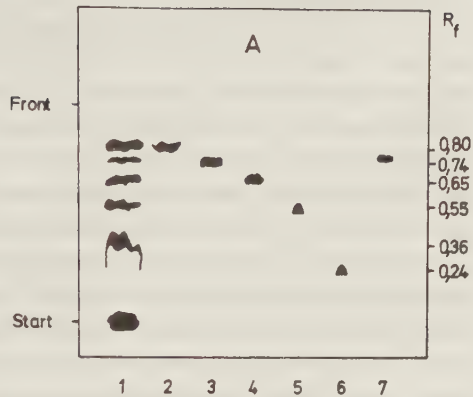
3.1.6.2. DC-Chromatographie der salzfreien zweiten P-10 Fraktion

Mit dem anhand des Rohextraktes entwickelten DC-Systems (vgl. 3.1.2.1.) sollte es nun möglich sein, die Bestandteile der salzfreien zweiten P-10 Fraktion chromatographisch zu analysieren und neben der IES-Verbindung III typische Begleitstoffe (AS, Peptide, Zucker) auf den Platten sichtbar zu machen. Die Probe wurde dazu in bidest. Wasser gelöst und die Kieselgel G Platten nach Entwicklung in Fließmittel IX (vgl. 6.4.) auf IES (van Urk), AS und Peptide (Ninhydrin) und Zucker (Anilin-Dephenylamin) getestet. Wie erwartet, färbte sich der Startfleck für alle 3 Substanzen positiv an (Abb. 16). Ebenfalls in Übereinstimmung mit der Proteinbestimmung dieser Fraktion (Tab. 32) wurde nach Ninhydrinbehandlung außer der Färbung am Start nur noch eine einzige Peptidbande mit einem R_f -Wert von 0,38 gefunden (Abb. 16).

Die DC ergab weiterhin, daß sich insgesamt 5 verschiedene Zuckerverbindungen (R_f -Werte: 0,36; 0,55; 0,65; 0,74; 0,80) vom sich ebenfalls anfärbenden Startfleck abtrennten und die Oligosaccharide mengenmäßig den größten Bestandteil dieser Fraktion - ebenso wie bei der ersten P-2-Fraktion (vgl. 3.2.2.2.) - darstellen. Bei dem Zucker mit einem R_f -Wert von 0,80 handelt es sich dabei offensichtlich um Glucose, die in diesem Fließmittel einen R_f -Wert von 0,80 besitzt, obwohl es sehr erstaunlich ist, daß sich nach mehrfachen Gelfiltrationsschritten (AcA 54, P-2, P-10. P-2) und wiederholtem Abtrennen niedermolekularer Fraktionen im salzfreien IES-haltigen zweiten P-10 Peak noch freie Glucose finden läßt.

Abb. 16: DC-Chromatographie der salzfreien zweiten P-10 Fraktion auf Kieselgel G in Fließmittel IX (vgl. 6.4.); Nachweis der Zucker mit Anilin-Diphenylamin (A), der Aminosäuren und Peptide mit Ninhydrin (B) und der IES mit van Urk (C)

- 1: salzfreie zweite P-10 Fraktion, gelöst in dest. Wasser
- 2: Glucose
- 3: Saccharose
- 4: Raffinose
- 5: Stachiose
- 6: Glucuronsäure
- 7: Fructose
- 8: Tryptophan
- 9: IES-Seryl ester
- 10: IES
- 11: IES-Methylester



Das Chromatographieren von Vergleichssubstanzen zeigte, daß es sich bei dem Zucker mit einem $R_f = 0,74$ um ein Disaccharid handeln könnte, da Saccharose einen R_f -Wert von 0,73 in diesem DC-System aufweist, während sich alle Monosaccharide durch einen höheren R_f -Wert von 0,76-0,80 auszeichnen (Glucose: 0,80; Xylose: 0,79; Mannose: 0,77; Ribose, Arabinose, Fructose: 0,76). Deshalb könnte sich der Zucker mit einem R_f -Wert von 0,65 aus 3 Einheiten zusammensetzen, da der R_f -Wert von Raffinose bei 0,66 liegt. Stachiose, ein aus 4 Einheiten bestehender Zucker, besitzt einen R_f -Wert von 0,54, der gut mit dem R_f -Wert von 0,55 des 2. sich über DC abgetrennten Zuckers (Abb. 16) der salzfreien zweiten P-10 Fraktion übereinstimmt (Tab. 24). Abschließend läßt sich noch sagen, daß die stärkste Zuckeranfärbung am Start sowie beim R_f -Wert von 0,36 und 0,80 auftrat, während sich die restlichen 3 Zucker nur relativ schwach anfärbten.

Tab.24: Vergleich der über DC aufgetrennten Zucker der salzfreien zweiten P-10 Fraktion mit verschiedenen Substanzen anhand ihrer R_f -Werte (Kieselgel G, Fließmittel IX: vgl. 6.4., Farbreaktion mit Anilin-Diphenylamin)

salzfreie zweite P-10 Fraktion R_f -Werte	Vergleichssubstanzen	
	Zucker	R_f -Werte
0,80	Glucose	0,80
	Xylose	0,79
	Mannose	0,77
	Ribose, Arabinose, Fructose	0,76
0,74	Saccharose	0,73
0,65	Raffinose	0,66
0,55	Stachiose	0,54
0,36	Glucuronsäure	0,24
0,00		

3.1.7. Gelfiltration der ersten P-2 Fraktion über Biogel P-2 und P-4 im Vergleich zu Biogel P-10

Da einerseits bei der Entsalzung der zweiten P-10 Fraktion so hohe IES-Verluste (= 56 %) durch unvollständige Abtrennung der Puffersalze von der gebundenen IES (Verbindung III) auftraten (vgl. 3.1.6.1.) und andererseits das MG dieser gebundenen IES sicher unterhalb 2000 Daltons lag (vgl. 3.2.5.1.), schien es günstiger, die erste P-2 Fraktion (= entsalzter 3. AcA-Peak) nicht erst über Biogel P-10 (Abb. 20), sondern gleich über ein Gel aufzutrennen, dessen Fraktionierungsbereich dem MG der IES-Verbindung III entspricht. Biogel P-2 schien dafür sehr geeignet, da Substanzen > 1800 Daltons im Ausschlußpeak erscheinen, während alle Substanzen < 1800 bis 100 Daltons aufgetrennt werden. Entgegen den Erwartungen wurde aber die gebundene IES (Verbindung III), obwohl 5×10^{-2} M Puffer als Elutionsmittel verwendet wurde, bereits im absteigenden Ast des Ausschlußpeaks von der Säule wieder gemeinsam mit der gelbgefärbten Substanz eluiert, ohne sich also von den Proteinen mit einem MG > 2000 Daltons abzutrennen. Im eigentlichen Fraktionierungsbereich der Säule trennten nur 3 kleinere, weitere Peaks auf, die alle keine IES aufwiesen. Deshalb wurde jetzt versucht, die erste P-2 Fraktion über Biogel P-4 aufzutrennen, dessen Fraktionierungsbereich von 800 bis 4000 Daltons reicht und zudem sollte die gewählte geringe Partikelgröße des Gels von 200 bis 400 mesh besonders gute Trennergebnisse liefern. Dennoch ließ das mit 5×10^{-2} M Puffer erhaltene Elutionsprofil dieser P-4 Säule hinsichtlich der Trennschärfe zu wünschen übrig, da die einzelnen Peaks, besonders im auf den Ausschlußpeak folgenden Bereich (MG: 1000-2000 Daltons), alle stark ineinander übergingen. Die IES-Bestimmung ergab, daß in jedem der eluierten Peaks (vermutlich aufgrund ihrer unscharfen Abtrennung voneinander) gebundene IES vorlag, wobei die Hauptmenge (= 67 %) im MG-Bereich von ca. 1000 bis 2000 Daltons gefunden wurde. In Übereinstimmung damit nahm auch die gelbliche Färbung der Eluate mit der IES-Menge zu und erreichte ihr Maximum ebenfalls im Bereich von 1000 bis 2000 Daltons, um sich dann wieder abzuschwächen.

Zusätzlich wurde diesmal aus jeder 2. Säulenfraktion (5 ml/Fraktion) je 0,4 ml entnommen und damit eine Zuckerbestimmung mit Hilfe des Anthron-Reagenzes nach SNELL u. SNELL (1955) durchgeführt. Insgesamt konnten anhand der bei 623 nm gemessenen Ex-

tinktion über das ganze Elutionsprofil hinweg 6 Zuckerpeaks aufgezeichnet werden, wovon 3 im MG-Bereich von 1000 bis 2000 Daltons zu finden waren. Aufgrund der insgesamt schlechten Trennungsleistung dieser P-4 Säule war aber eine eindeutige Zuordnung der Zucker- und Proteinpeaks zueinander, sowie der IES nicht möglich.

Der Vergleich mit dem Biogel P-10 Säulenlauf (Abb. 20) zeigt eigentlich deutlich, daß hier die IES-Trennung wesentlich schärfer verlaufen war, da nur ein Peak (zweiter P-10) gebundene IES (Verbindung III) enthielt im Gegensatz zu den P-4 Säulenpeaks. Obwohl die gebundene IES (Verbindung III) ein MG zwischen 1000 und 2000 Daltons aufweist (vgl. 3.2.5.1.), d.h. damit der Trennbereich des P-4 Gels (800-4000 Daltons) optimal zutreffen müßte, konnte mit diesem Gel keine Auftrennung erreicht werden. Wie es schien, "schmierte" die IES-Verbindung III gemeinsam mit einer gelbgefärbten Substanz über die ganze Säule mit einem Elutionsmaximum zwischen 1000 und 2000 Daltons. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine zu geringe Ionenstärke des verwendeten Puffers ($5 \times 10^{-2} \text{ M Na-Phosphatpuffer}$), womit offensichtlich nicht alle Wechselwirkungen, die ja vor allem bei basischen und aromatischen niedermolekularen Verbindungen auftreten, zwischen Gelmatrix und aufzutrennenden Substanzen unterbunden werden konnten. Vielleicht wirkt sich dabei auch die geringe Partikelgröße (200-400 mesh) negativ aus, da die Biogel P-10 Säule mit der üblicherweise verwendeten mesh-Zahl des Gels von 100-200 und einem ebenfalls $5 \times 10^{-2} \text{ M Na-Phosphatpuffer}$ eine bessere Trennleistung aufweist.

3.1.8. Fällungen IES-haltiger Fraktionen mit dem Lectin Concanavalin A

Lectine finden als analytische Reagentien für die Erkennung von Zuckern und deren spezifische Bindungen in Polysacchariden sowie Glykoproteinen Verwendung und dienen zur Isolierung und Charakterisierung von kohlenhydrathaltigen Makromolekülen. Ihre spezifische Wechselwirkung mit Sacchariden kann dabei mit einer Antigen - Antikörper-Reaktion verglichen werden. Das Phytohämagglutinin Concanavalin A (Con A) bindet z.B. spezifisch α -D-Mannose $> \alpha$ -D-Glucose $> \alpha$ -D-N-Acetylglucosamin und sterisch verwandte Zuckerreste, wobei für die Bindung die freien Hydroxylgruppen an C₃, C₄ und C₆ des Zuckerringes entscheidend sind (GOLD-

STEIN et al., 1965). Mit Polysacchariden (z.B. Glykogen) sowie Glykoproteinen, die eine genügende Anzahl der für die Bindung entscheidenden Gruppen aufweisen, bildet Con A unlösliche Komplexe (CLARKE u. DENBOROUGH, 1971), wobei aber die Ausfällung zu einem gewissen Maß auch vom Grad der Verzweigung abhängig ist (LLOYD, 1970).

3.1.8.1. Con A Fällung mit der ersten P-2 Fraktion

Von der ersten P-2 Fraktion war bekannt, daß sowohl Glykoproteine (vgl. 3.2.2.3., Abb. 19) als auch Oligosaccharide (DC, Abb. 15) vorliegen. Trotzdem konnte die erste P-2 Fraktion durch Bindung an Con A Sepharose nicht aufgetrennt werden (vgl. 3.1.4.), was aber z.B. auch an einer ungenügenden Kapazität der Säule gelegen haben kann. Ebenfalls können Oligosaccharide zwar an die Säule gebunden haben, jedoch ist dies über die durchgeführte Extinktionsmessung der Eluate bei 254 und 280 nm aber nicht ermittelt worden. Deshalb sollte die in bidest. Wasser gelöste erste P-2 Fraktion direkt mit Con A versetzt werden, um zunächst einmal anhand der Trübungsmessung bei $E = 600 \text{ nm}$ (DOYLE u. CRONHOLM, 1969) festzustellen, ob sich unlösliche Con A Zuckerkomplexe bilden. Da die Komplexbildung und Ausfällung zeitabhängig ist, wurde die Trübung der Proben zu verschiedenen Zeiten ermittelt (Tab. 25). Zudem wurde bei gleichbleibender Con A Konzentration (0,8 mg/2,4 ml) die eingesetzte Menge der ersten P-2 Fraktion variiert.

Tab. 25: Trübungsmessung ($E = 600 \text{ nm}$) der unlöslichen Con A Zuckerkomplexe aus der ersten P-2 Fraktion nach verschieden langen Reaktionszeiten bei 4°C

Con A mg	Probe mg	Con A:Probe mg : mg	Volumen ml	$E = 600 \text{ nm}$			
				10 min	30 min	60 min	120 min
0,8	0,1	8 : 1	2,4	0,002	0,006	0,010	0,011
0,8	1,0	8 : 10	2,4	0,050	0,056	0,062	0,066
0,8	5,0	8 : 50	2,4	0,215	0,240	0,265	0,280

Zeichnet man die gemessenen Extinktionswerte eines Versuchsansatzes gegen die Zeit auf, so erhält man jedesmal Sättigungskurven, d.h. nach 120 Minuten Reaktionszeit ist alles mit Con A reagierende Substrat ausgefällt. Da bei konstanter Con A Konzentration die zunehmende Menge der ersten P-2 Fraktion eine größere Trübung bewirkte, stellten in den 3 Versuchsreihen (Tab. 25) die mit Con A komplexbildenden Substanzen der ersten P-2 Fraktion den limitierenden Faktor dar. Aufgrund der spezifischen Bindung des Con A kann daraus gefolgert werden, daß in der ersten P-2 Fraktion α -D-Glucosyl- oder sterisch verwandte Zuckerreste vorliegen müssen.

3.1.8.2. IES-Bestimmung nach Con A Fällung der salzfreien zweiten P-10 Fraktion

Ausgehend von der Tatsache, daß in der ersten und zweiten P-10 Fraktion qualitativ zwar dieselben Zuckerkomponenten, aber bezüglich des Proteingehaltes große Unterschiede nach jeweiliger Entsalzung vorliegen (vgl. 3.2.4.), war es nun interessant festzustellen, in welcher der beiden Fraktionen sich die mit Con A komplexbildenden Substanzen der ersten P-2 Fraktion nach deren Auftrennung über Biogel P-10 (Abb. 20) finden ließen. Deshalb wurde sowohl die erste P-10 als auch die zweite P-10 Fraktion - jeweils nach Entsalzung - mit Con A im Überschuß versetzt. Da zugleich der IES-Gehalt der zweiten P-10 Fraktion nach der Fällung bestimmt werden sollte, wurden beide Proben zur Stabilisierung der IES in $10^{-2}M$ Na-Phosphatpuffer pH = 7,0/ $10^{-4}M$ Hydrochinon gelöst. Nach einer Reaktionszeit des eingesetzten Con A (erster P-10: 2 mal je 1 mg; zweiter P-10: 2 mal je 5 mg) von 2 mal 60 Minuten wurde die Trübung bei $E = 600$ nm gemessen (Tab. 26).

Tab. 26: Trübungsmessung ($E = 600$ nm) der unlöslichen Con A Zuckerkomplexe der salzfreien ersten und zweiten P-10 Fraktion (Δ 10 g Karyopsen) nach 120 Minuten Reaktionszeit bei $4^{\circ}C$

P-10 Fraktion	Gewicht mg	Con A mg	Con A:Probe mg : mg	Volumen ml	E_{600} nm
Peak 1	7,6	2,0	1 : 3,8	6,0	0,21
Peak 2	30,25	10,0	1 : 3,0	6,0	0,18

Aus Tab. 26 ist bereits ersichtlich, daß Peak 1 der P-10 Säule mehr Trübung, d.h. mehr komplexbildende zuckerhaltige Substanzen aufweist als der salzfreie Teil der zweiten P-10 Fraktion. Andererseits können, da der zweite P-10 Peak ein relativ niedriges MG (< 2000 Daltons, vgl. 3.2.5.1.) aufweist, hier noch zusätzlich zu den ausgefallenen Komplexen lösliche Con A-Zuckerverbindungen (z.B. Con A-Glucose) vorliegen.

Da aber nun hauptsächlich die Frage interessierte, ob nach Abzentrifugation der ausgefallenen Con A-Komplexe des salzfreien zweiten P-10 Peaks die IES-Verbindung III im Überstand oder aber im Rückstand zu finden sei, wurden diese beiden Fraktionen hydrolysiert. Nach Ätherextraktion konnte anhand der DC-Platten eindeutig nachgewiesen werden, daß im Rückstand keine IES vorlag, während im Überstand die gebundene IES mit einer Menge von $30 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ Körner fast quantitativ ($= 94 \%$) gefunden wurde. Con A bildet also mit der IES-Verbindung III keinen unlöslichen Komplex.

3.1.8.3. Auftrennung des Überstandes der ersten P-2 Fraktion nach Con A-Fällung über Biogel P-10

Da sicher feststand, daß nach Fällung mit Con A die IES-Verbindung III im Überstand verbleibt, konnte diese Tatsache als Reinigungsschritt in die Auftrennung der gebundenen IES miteinbezogen werden. Aufgrund seines MG von 30000 Daltons (= Monomeres) und selbst der Untereinheit von 17000 Daltons (Mc CUBBIN u. KAY, 1971) läßt sich nämlich das überschüssige, nicht gefällte Con A in der Lösung von der IES-Verbindung III mit einem MG < 2000 Daltons (vgl. 3.2.5.1.) sehr leicht mittels Gelfiltration abtrennen. Deshalb wurde nun die Con A-Fällung mit der ersten P-2 Fraktion durchgeführt, damit der nach Abzentrifugation der ausgefallten Con A-Komplexe anschließend lyophilisierte Überstand über Biogel P-10 aufgetrennt und so sowohl freies als auch löslich zuckergebundenes Con A von der IES-Verbindung III abgetrennt werden konnte.

Da die IES-Verbindung III mittels Con A-Fällung möglichst ohne große Verluste aufgereinigt werden sollte, wurde die erste P-2 Fraktion ($\hat{=}$ 5 g Karyopsen) wieder in $3 \text{ ml } 10^{-2} \text{ M}$ Na-Phosphatpuffer pH = $7,0/10^{-4} \text{ M}$ Hydrochinon gelöst und 2 mal je 60 Minuten mit je 2 mg Con A (1 ml), das im selben Puffer gelöst war, bei 4°C versetzt. Nach Abzentrifugation der ausgefallten Con A-Komplexe wurde der Rückstand zur IES-Bestimmung hydrolysiert.

In Übereinstimmung mit dem Ergebnis unter 3.1.8.2. war keine IES mit Con A ausgefällt worden.

Bei der Gelfiltration des lyophilisierten Überstandes über Biogel P-10 zur Abtrennung des freien als auch löslich zucker-gebundenen Con A von der IES-Verbindung III erhielt man - außer des durch Con A bedingten vergrößerten Ausschlußpeaks - ein mit Abb. 20 identisches Elutionsprofil. Um aber sicher zu gehen, an Con A keine IES gebunden zu haben, wurde der erste P-10 Peak sowie zusätzlich auch gleich der 3. Peak einer IES-Bestimmung unterworfen. In beiden Fällen ließ sich keine IES nachweisen.

3.1.9. Con A-Fällung unter Zusatz von Hydrochinon und Auftrennung der salzfreien zweiten P-10 Fraktion über Biogel P-4

Der vom überschüssigen Con A abgetrennte zweite IES-haltige P-10 Peak mußte nun vor weiterer Auftrennung zunächst über Biogel P-2 (2,4/70 cm) entsalzt werden. Die salzfreie Fraktion sollte dann über Biogel P-4 (200-400 mesh) weiter aufgetrennt werden. Aufgrund der bisher mit Biogel P-4 (vgl. 3.1.7.) gemachten Erfahrung wurde diesmal aber zur Gelfiltration ein 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0 verwendet, wodurch nun tatsächlich eine Auftrennung der salzfreien IES-haltigen P-10 Fraktion (nach Con A-Fällung) erreicht werden konnte. Das Elutionsprofil (Abb. 21) zeigte außer einem kleinen Ausschlußpeak (= Peak 1) zwei etwa gleich große Hauptpeaks (= Peak 2 und 3). Daran anschließend wurden von der Säule nur mehr Fraktionen (= Peak 4) mit abnehmender Extinktion bei 280 nm eluiert. Die danach mit allen Peak-eluataten durchgeführte IES-Bestimmung zeigte dann auch, daß nur Peak 3 und 4 in etwa gleiche Mengen an gebundener IES (Verbindung III) aufwiesen (Abb. 21).

3.1.10. Con A-Fällung ohne Hydrochinon und Auftrennung der salzfreien zweiten P-10 Fraktion

Bei der Con A-Fällung der ersten P-2 Fraktion (Δ 5 g Karyopsen) mit Zusatz von Hydrochinon (vgl. 3.1.8.3.) war bei einem Verhältnis Con A:Probe von 1:5 nur eine sehr schwache Trübung (Volumen: 5 ml) beobachtet und nach Abzentrifugation entsprechend

wenig Rückstand erhalten worden im Gegensatz zur Con A-Fällung der in bidest. Wasser gelösten ersten P-2 Fraktion (5 mg Δ ca. 1,3 g Karyopsen), wobei die Trübung (Volumen: 2,4 ml) bei einem Verhältnis Con A zur ersten P-2 Probe von 4:25 sehr gut sichtbar und meßbar gewesen war (Tab. 25). Da der einzige bedeutende Unterschied der beiden Fällungen im Zusatz von Hydrochinon bestand, mußte geprüft werden, ob Hydrochinon tatsächlich auf die Con A-Zuckerkomplexbildung einen Einfluß ausübt. Deshalb wurden je 2 mg Con A einmal in 2 ml 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0/ 10^{-4} M Hydrochinon, sowie in 2 ml reinem Puffer ohne Hydrochinon gelöst und zu beiden Ansätzen adäquate Mengen einer Glykogenlösung zugesetzt. Ohne Hydrochinon erfolgte dicke Ausflockung des unlöslichen Zucker-Con A-Komplexes, während sich bei der Probe mit Hydrochinon nur eine schwache Trennung zeigte. Auch nach Verlauf von 2 Stunden konnte der Unterschied der Trübung immer noch sehr gut erkannt werden. Offenbar geht Hydrochinon selbst mit Con A eine Verbindung ein, die die Wechselwirkung Con A zu Glykogen empfindlich zu stören scheint. Nach diesem Ergebnis wurde nun die nächste Con A-Fällung ohne Zusatz von Hydrochinon durchgeführt. Zwei erste P-2 Fraktionen (Δ 10 g Karyopsen) wurden dazu in 4 ml 10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0 gelöst und 2 mal je 60 Minuten mit je 4 mg Con A (1 ml) bei 4°C versetzt. Nach Abzentrifugation des diesmal deutlich sichtbaren Rückstandes und darauffolgender Hydrolyse war aber ebenfalls keine IES darin nachzuweisen. Der lyophilisierte IES-haltige Überstand lieferte nach Gelfiltration über Biogel P-10 zur Abtrennung des Con A dieselbe Peakverteilung wie nach der Fällung mit Hydrochinonzusatz (vgl. 3.1.8.3.). Ebenfalls enthielt Peak 1 sowie Peak 3 der P-10 Säule keine IES. Da die Auftrennung des Überstandes nach der Con A-Fällung der ersten P-2 Fraktion - ob mit oder ohne zugesetztes Hydrochinon - immer dasselbe IES-haltige Elutionsprofil liefert wie die Gelfiltration der ersten P-2 Fraktion ohne Auftrennung mittels Con A (Abb. 20), werden wahrscheinlich nur Oligosaccharide ausgefällt, die aber mengenmäßig den größten Bestandteil der ersten P-2 Fraktion darstellen (vgl. Abb. 15).

3.1.10.1. DC-Chromatographie der salzfreien zweiten P-10 Fraktion

Der Sinn der Fällungen mit Con A ist gewesen, Glykoproteine, sowie Kohlenhydrate, die nicht an IES gebunden vorliegen und sich

aber trotzdem mittels Gelfiltration nicht von der IES-Verbindung III abtrennen lassen, aus der IES-haltigen Fraktion durch Komplexbildung zu entfernen. Mittels DC-Chromatographie waren in der salzfreien zweiten P-10 Fraktion (ohne Con A-Fällung) fünf verschiedene Zuckerverbindungen sichtbar gemacht worden (vgl. 3.1.6.2., Abb. 16), die sich alle vom Startfleck, wo die IES-Verbindung III vorliegt, abtrennten.

Mittels erneuter DC-Chromatographie der salzfreien zweiten P-10 Fraktion konnte jetzt sehr leicht geprüft werden, ob durch Con A Fällung der ersten P-2 Fraktion (ohne Hydrochinon) und nach Auftrennung des Überstandes über Biogel P-10 die Anzahl der sich über DC abtrennenden Zucker (Tab. 24) reduziert wurde. Ebenfalls sollten auf DC gleichzeitig wiederum IES sowie die AS und Peptide der nach Con A-Fällung abgetrennten salzfreien zweiten P-10 Fraktion sichtbar gemacht werden. Die Probe wurde dazu in bidest. Wasser gelöst, auf Kieselgel G chromatographiert und nach Entwicklung in Fließmittel IX (vgl. 6.4.) auf Zucker (Anilin-Diphenylamin), AS und Peptide (Ninhydrin) und IES (van Urk) getestet. Der Startfleck färbte sich wiederum - wie erwartet - für alle 3 Substanzen positiv an. Neben der positiven Ninhydrin-Reaktion am Start färbte sich ebenfalls wieder bei einem R_f -Wert von 0,40 noch zusätzlich eine Peptidbande an (vgl. Abb. 16). Die mit Anilin-Diphenylamin angesprühte DC-Platte zeigte diesmal jedoch außer am Start keine Farbreaktion mehr, d.h. mit Con A wurden tatsächlich offensichtlich alle Zucker der salzfreien zweiten P-10 Fraktion ausgefällt, die sich vorher (= ohne Con A-Fällung) nur über DC von der gebundenen IES (Verbindung III) abtrennen ließen (Abb. 16). Selbst in einem speziell für Zuckertrennungen entwickelten Fließmittel (System X, Kieselgel G, vgl. 6.4.) und mit Orcin/ H_2SO_4 als Färbereagens, das im Nachweis wesentlich empfindlicher ist als Anilin-Diphenylamin, ließ sich außer am Start keine positive Zuckerreaktion mehr erhalten, d.h. auch in diesem Fließmittel konnte der Startfleck nicht weiter aufgetrennt werden. Vom Startfleck, der sowohl eine für Zucker als auch Peptid und IES positive Reaktion zeigt, trennt sich jetzt also über DC nur mehr eine Peptidbande ab. Zudem konnte anhand der spezifischen Farbreaktion von Orcin/ H_2SO_4 erkannt werden, daß der sich gelbbraun anfärbende Zuckerfleck (Start) nur die 3 möglichen Komponenten Glucose, Galaktose und Inosit aufweisen kann, die mit diesem Sprühreagens ebenfalls eine gelbbraune Farbe annehmen. Die weiteren mittels PC in der

zweiten P-10 Fraktion - allerdings ohne Con A-Fällung - nachgewiesenen Zucker (Xylose, Arabinose, vgl. 3.2.4.) färben sich mit diesem Sprühreagenz blauschwarz. Sie können daher in der zweiten P-10 Fraktion nach Con A-Fällung nicht mehr vorliegen. Dieses Ergebnis, daß nur die Zucker der ersten P-2 Fraktion mit Con A Komplexe bilden und nicht die Glykoproteine, bestätigt den Bindungsversuch der ersten P-2 Fraktion an Con A Sepharose (vgl. 3.1.4.), wobei ebenfalls aufgrund der minimalen Extinktion bei 280 nm im Eluat der an die Säule gebundenen Substanzen allenfalls eine Adsorption von reinen Kohlenhydraten an die Con A-Sepharose gefolgt wurde.

3.1.10.2. IES-Bestimmung nach Entsalzung der zweiten P-10 Fraktion

Nach dieser DC-Chromatographie war nun klar, daß die Con A-Fällung der ersten P-2 Fraktion einen wesentlichen Beitrag zur Reinigung und Isolierung der gebundenen IES lieferte, da hiermit auf elegante Weise alle Zucker, die bei den Gelfiltrationen immer mit der IES-Verbindung III cochromatographierten und sich nur über DC abtrennen ließen, aus der gebundenen IES-haltigen Fraktion entfernt wurden. Andererseits mußte mit einem Verlust an gebundener IES nach Con A-Fällung gerechnet werden, da die IES-Verbindung III in Lösung ohne Hydrochinon bekannterweise nicht stabil vorliegt (vgl. Tab. 17), zugesetztes Hydrochinon auf die Fällung aber einen störenden Einfluß ausübt (vgl. 3.1.10.). Deshalb mußte nun der IES-Wiederfund nach Con A-Fällung der ersten P-2 Fraktion ohne Hydrochinonzusatz und anschließender Auftrennung des lyophilisierten IES-haltigen Überstandes über Biogel P-10 bestimmt werden.

Anhand der IES-Bestimmungen nach Entsalzen der zweiten P-10 Fraktion über Biogel P-2 (vgl. 3.1.6.1.) war bekannt, daß sich die gebundene IES (Verbindung III) dabei immer im selben Verhältnis (4:5) auf das salzfreie und das phosphathaltige Säuleneluat verteilte. Deshalb konnte der IES-Verlust ebenso gut auch aus der Abnahme der IES-Menge in der salzhaltigen Säulenfraktion ermittelt werden, was den Vorteil hatte, daß die salzfreie zweite P-10 Fraktion zusätzlich für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung stand. Wie erwartet, nimmt der IES-Wiederfund ohne Zusatz von Hydrochinon bei der Fällung mit Con A stark ab, wobei die Abnahme von der Zeitdauer der Fällung abhängig ist (Tab. 27). Dies stimmt mit der schon früher festgestell-

ten Beobachtung überein, daß der Abbau der gebundenen IES (Verbindung III) in wäßriger Lösung zeitabhängig ist (vgl. Tab.17). Nach jeder Con A-Fällung wurde zusätzlich der abzentrifugierte Rückstand immer einer IES-Bestimmung unterworfen. Aber in keinem Fall ließ sich hier IES finden.

Tab. 27: Wiederfund der gebundenen IES in Prozent im salzhaltigen Teil des zweiten P-10 Peaks nach variierten Bedingungen bei der Con A-Fällung der ersten P-2 Fraktion, anschließender Auftrennung des lyophilisierten IES-haltigen Überstands über Biogel P-10 und Entsalzung der zweiten P-10 Fraktion über Biogel P-2

	ohne Con A-Fällung	nach Con A-Fällung		
		+ Hydroch. 2 Std.	- Hydroch. 2 Std.	- Hydroch. 1 Std.
IES-Wiederfund %	100	94	18	40

Obwohl der IES-Verlust bei 1-stündiger Fällungsdauer ohne Hydrochinon mit 60 % sehr hoch war, wurde diese Fällung für die weiteren Versuche beibehalten, da die Ergebnisse der parallel laufenden Untersuchungen mit den entsprechenden salzfreien zweiten P-10 Fraktionen hinsichtlich der damit verbundenen Reinigung und Isolierung der IES-Verbindung III sehr vielversprechend waren (vgl. 3.1.10.1.).

3.1.10.3. Gelfiltration der salzfreien zweiten P-10 Fraktion über Biogel P-2 und P-4

Aufgrund der MG-Bestimmung über Biogel P-4 (vgl. Abb. 21) des salzfreien zweiten P-10 Peaks nach Con A-Fällung unter Zusatz von Hydrochinon war bekannt, daß die IES-Verbindung III ein MG von <1800 Daltons aufweisen muß und wahrscheinlich im Bereich von 1200 Daltons von der P-4 Säule eluiert wurde (vgl. 3.2.5.2.). Damit wäre aber nun Biogel P-2 zur Gelfiltration wesentlich besser geeignet, da sein Fraktionierbereich von 100 bis 1800 Daltons reicht. Nach Gelfiltration der salzfreien zweiten P-10 Fraktion (Con A-Fällung: 2 Stunden, ohne Hydrochinon) über Biogel P-2 wurde die gebundene IES aber trotz Verwendung eines 0,1 M Na-Phosphatpuffers pH = 7,0 (vgl. 3.1.7.) in einer seitlichen

Schulter des Ausschlußpeaks wieder gemeinsam mit der gelbgefärbten Komponente (vgl. 3.2.7.) von der Säule eluiert. Davon trennte sich lediglich ein Peak mit einem MG von ca. 600 Daltons ab. Wie die IES-Bestimmung mittels DC zeigte, lag hier aber keine IES vor (vgl. Abb. 21).

Nach diesem Trennungsversuch über Biogel P-2 wurde wieder auf Biogel P-4 zurückgegriffen, wobei diesmal aber eine Partikelgröße von 100-200 mesh gewählt wurde (vgl. 3.1.7.). Mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0 trennte die salzfreie zweite P-10 Fraktion (Con A-Fällung: 1 Stunde, ohne Hydrochinon) über diese P-4 Säule so auf, daß das Elutionsprofil nach einem kleinen Ausschlußpeak zwei weitere, jedoch höhere Peakgipfel zeigte, die aber nur schlecht voneinander abgetrennt waren (Abb. 22). Da sich aufgrund dieser Säulentrennung - aufgezeichnete Extinktion bei 280 nm - eine Zuordnung der gebundenen IES (Verbindung III) nach deren Bestimmung zu den einzelnen Peaks wahrscheinlich nur ungenau durchführen ließ, sollte diesmal zunächst die Zucker-Verteilung über die Säule hinweg bestimmt und dann erst anschließend der IES-Gehalt in den zuckerhaltigen Fraktionen ermittelt werden. Die Zuckerbestimmung ließ sich mit Hilfe des Anthron-Reagenzes nach der Methode von SNELL u. SNELL (1955) sehr gut durchführen, wobei aber nur jede fünfte Säulenfraktion (1 ml/Fraktion) getestet wurde, um den Probenverlust (= 8 %) möglichst gering zu halten, da anschließend mit den zuckerhaltigen Fraktionen ja noch eine IES-Bestimmung durchgeführt werden sollte. Nach Aufzeichnen der bei 623 nm gemessenen Zuckerextinktion ergab sich über die ganze Säule hinweg nur ein einziger Peak, dessen Maximum etwa bei dem letzten höheren von der Säule eluierten und bei 280 nm aufgezeichneten Peak zu finden war (vgl. Abb. 22). Dieses Ergebnis nach Anthron-Reaktion deckt sich sehr gut mit der DC-Chromatographie (vgl. 3.1.10.1.), wobei sich nach Con A-Fällung (ebenfalls ohne Hydrochinon) auch nur mehr am Start eine einzige positive Zuckerfarbreaktion finden ließ.

Die IES-Bestimmung ergab anschließend, daß der 1. Peak mit leicht ansteigendem Zuckergehalt (E_{623} bis ca. 0,1) ca. 1,5 μg IES/100 g Körner (= 15 % der insgesamt gefundenen Menge) enthält, während im Zuckerpeak (= 2. Peak, $E_{623 \text{ max.}}$ ca. 0,6) die Hauptmenge mit 8,5 μg IES/100 g Körner (= 85 %) vorlag. Im nachfolgenden Peak (= 3. Peak), der zwar keinen Zucker ($E_{623} = 0$)

enthält, aber eine absteigende Extinktion bei 280 nm aufweist, konnte keine IES gefunden werden. Aus dieser Zucker- und IES-Bestimmung (Abb. 22) folgt daher, daß die IES-Verbindung III gemeinsam mit dem einzigen Zuckerpeak der Fraktion von der Biogel P-4 Säule eluiert wurde.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis steht wiederum die DC-Chromatographie der entsprechenden Fraktion (vgl. 3.1.10.1.), wobei ebenfalls sowohl die IES- als auch die einzige Zuckeranfärbung gemeinsam am Start zu finden war.

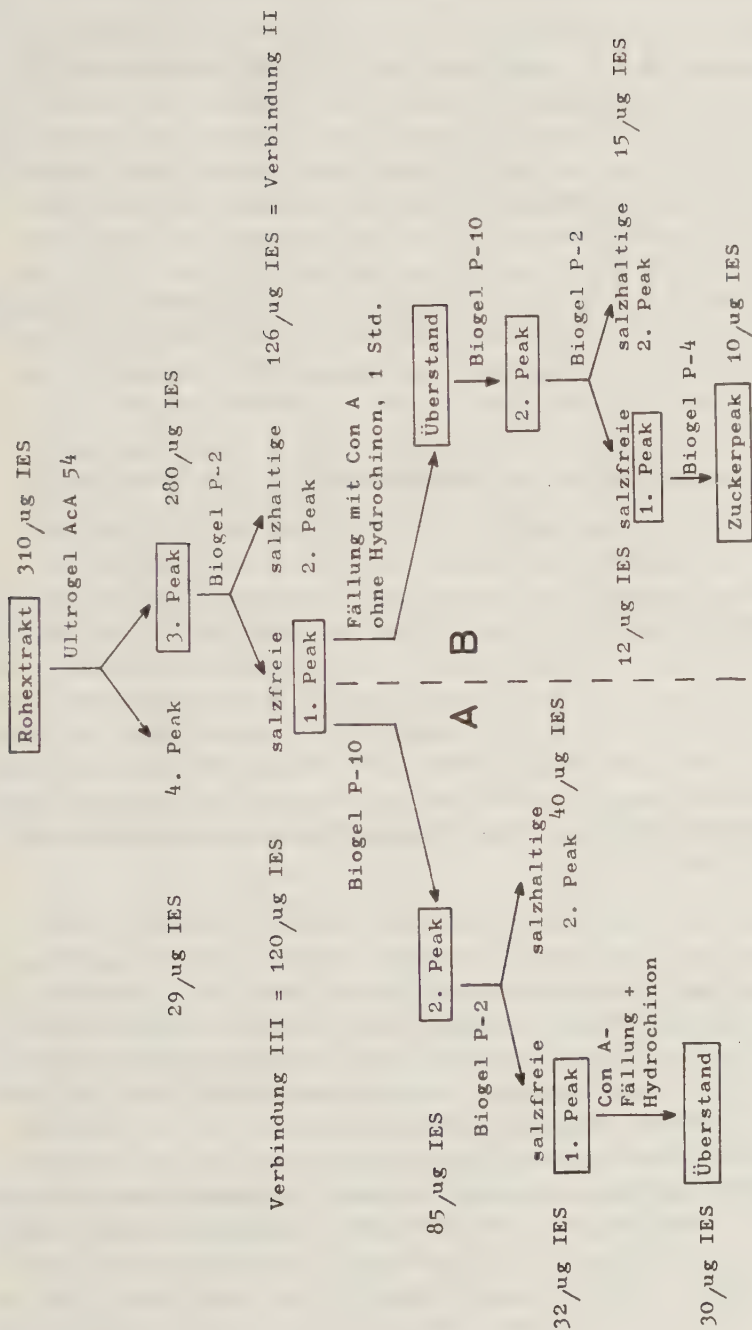
3.1.11. Optimierter Reinigungsgang der IES-Verbindung III des Wasserextraktes von mit n-Butanol entfetteten Haferkaryopsen

Um die Aufreinigung der niedermolekularen IES-Verbindung III aus mit n-Butanol entfetteten Haferkaryopsen - ausgehend vom Rohextrakt bis zur zuckerhaltigen Fraktion - übersichtlich darzustellen, werden die einzelnen Auftrennungsschritte zusammen mit den Angaben über den IES-Gehalt der jeweiligen Fraktionen noch einmal zusammengefaßt. Von den beiden im Rohextrakt vorliegenden IES-Verbindungen II und III wurde nach ihrer Trennung über Biogel P-2 beim Entsalzen des 3. AcA-Peaks nur die salzfreie Fraktion mit der höher molekularen IES-Verbindung III weiter aufgereinigt.

Der Weg A der Auftrennung (Schema 5) diente dabei hauptsächlich zur Gewinnung und zum Sammeln von Informationen über die Eigenschaften dieser IES-Verbindung III, während der Weg B zur Isolierung einer Fraktion führte, die die zuckerhaltige IES-Verbindung III mit einem MG zwischen 1100 und 1400 Daltons (vgl. 3.2.5.3.) enthält.

3.2. Charakterisierung IES-haltiger Fraktionen

Um eine genaue Charakterisierung von einer aufgereinigten IES-Verbindung geben zu können, ist es notwendig, bereits während der Reinigung (vgl. Schema 5) mit den jeweiligen aufgetrennten IES-haltigen Fraktionen Untersuchungen zur Ermittlung der Inhaltsstoffe sowie deren Eigenschaften durchzuführen. Aufgrund dieser Untersuchungen ist es dann möglich, aus den charakteristischen Eigenschaften der gebundenen IES des Wasserextraktes Schlüsse über die niedermolekulare IES-Verbindung III zu ziehen.



Schema 5: Darstellung der Aufreinigung der niedermolekularen IES-Verbindung III aus dem Rohextrakt von Haferkaryopsen mit Angabe des IES-Gehaltes der aufgetrennten Fraktionen in µg IES/100 g Körner (± 75 g Karyopsen)

3.2.1. Molekulargewichtsbestimmung der ersten P-2 Fraktion

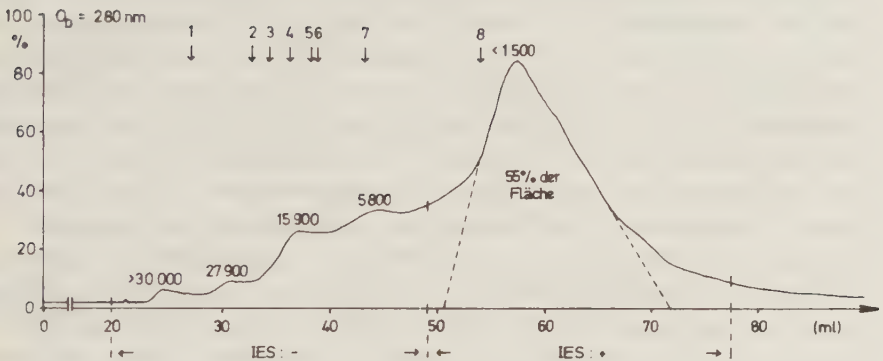
Aufgrund von DC-Trennungen (vgl. 3.1.2.) war sicher nachgewiesen worden, daß im Rohextrakt bereits zwei verschiedene IES-haltige Verbindungen (II und III) vorliegen, die zwar gemeinsam von der AcA-Säule (3. Peak, Abb. 12) eluiert werden, sich aber beim Entsalzen der IES-haltigen AcA-Fraktion über Biogel P-2 in einen salzfreien (1. Peak) und salzhaltigen Peak (2. Peak) voneinander trennen lassen. Die erste P-2 Fraktion enthält dabei die nur wasserlösliche IES-Verbindung III (vgl. 3.1.2.2.), die sich im Gegensatz zur IES-Verbindung II der zweiten P-2 Fraktion durch ein höheres MG auszeichnen muß. Deshalb sollte nun, da nur das MG des IES-haltigen AcA-Peaks (Abb. 12) bereits bekannt war, das der ersten P-2 Fraktion bestimmt werden.

3.2.1.1. Gelfiltration über Sephadex G 50

Der Trennbereich des Sephadex G 50-Gels reicht für globuläre Proteine und Peptide von 1500 bis 30000 Daltons. Um nun bei der Molekulargewichtsbestimmung exakte Werte zu erhalten, wurde eine dünne, lange Säule gewählt, die zunächst mit der gelösten ersten P-2 Fraktion (1/4 Probe Δ 1,25 g Karyopsen) beladen wurde. Nach Eichung der Säule ergab sich für den IES-haltigen Peak (Verbindung III) ein MG von unter 1500 Daltons. Obwohl die Auftrennung nicht sehr gut zu nennen ist, wurden insgesamt von der Säule 5 Peaks eluiert, wovon der letzte, IES-haltige Peak (Verbindung III) mit ca. 55 % der Gesamtfläche den weitaus größten darstellt (Abb. 17).

Vergleicht man diese Säulentrennung (Abb. 17) mit der Disc-Elektrophorese (Abb. 13a), so könnten diesem IES-haltigen Peak eventuell die beiden Hauptbanden (Nr. 2 und 3) mit insgesamt 60 % Proteinanteil zugeordnet werden, wovon die stärkere (Nr. 2) aufgrund des Vergleichs mit der elektrophoretischen Auftrennung der ersten P-2 Fraktion des NaCl-Wasserextraktes (Abb. 10a) als Glykoproteinbande angesehen werden kann.

Da aber nach ANDREWS (1965) Glykoproteine bei MG-Bestimmungen über Sephadexgelen starke Abweichungen vom Standardverhalten zeigen und da auch aufgrund der DC-Ergebnisse der ersten P-2 Fraktion (vgl. 3.1.2.2.), wobei der IES-haltige Fleck selbst nach zweidimensionaler Chromatographie ebenfalls auch auf Zucker und AS positiv reagierte, als IES-bindende Substanz möglicherweise auf



1 = Ausschuß	: MG = 30 000	5 = Ribonuclease:	MG = 13 600
2 = α -Chymotrypsin	: MG = 25 300	6 = Cytochrom c	: MG = 12 500
3 = Trypsin	: MG = 23 300	7 = Insulin	: MG = 6 000
4 = Myoglobin	: MG = 17 800	8 = Ausschuß	: MG = 1 500
(Pferd)			

Abb. 17: Molekulargewichtsbestimmung der ersten P-2 Fraktion
(1/4 Probe Δ ca. 1,25 g Karyopsen) über Sephadex G 50
fine bei 4°C
Trennbereich: 1500-30000 Daltons
Säule : 0,9/85 cm
Puffer : 10^{-2} M Imidazol + 0,1 M KCl pH = 7,0
Durchfluß : 4,1 ml/h

ein Glykoprotein geschlossen werden kann, mußte mit einer weiteren Methode zur MG-Bestimmung dieses Ergebnis überprüft werden.

3.2.1.2. SDS-Elektrophorese

Da sich zur MG-Bestimmung von Polypeptiden die SDS-Elektrophorese sehr gut eignet, wurde ein System gewählt, das in Anlehnung an SHAPIRO et al. (1967) und WEBER u. OSBORNE (1969) entwickelt worden ist. Im Gegensatz zur Disc-Elektrophorese, bei der die elektrophoretische Mobilität der Proteine sowohl von der Ladung als auch von der Molekülgröße abhängig ist (ORNSTEIN, 1964 und DAVIS, 1964), wandern die Proteine in Gegenwart des anionischen Tensids-Natriumdodecylsulfat- allein nach der Molekülgröße als SDS-Proteinkomplexe.

Mit Hilfe von Eichsubstanzen (MG zwischen 3000 und 22000 Daltons) und ihrer relativen Mobilität nach der SDS-Elektrophorese, bezogen auf Bromphenolblau, konnten aus der resultierenden Eichgeraden die MG der ebenfalls mit Coomassieblau angefärbten Proteinbanden der ersten P-2 Fraktion bestimmt werden. Auf die 3-minütige Erwärmung bei 90°C kann bei der ersten P-2 Fraktion übrigens verzichtet werden, da die Inkubation mit SDS bei Raumtemperatur nach der Elektrophorese das gleiche Auftrennungsbild liefert (Abb. 18). Leicht unterschiedliche Eichkurven und damit MG der Banden der ersten P-2 Fraktion wurden aber erhalten, je nachdem, ob die 4 Eichproteine gemeinsam auf ein Gel oder aber jeweils einzeln auf 4 Gele aufgetragen wurden (Tab. 28). Da die erste P-2 Fraktion Proteine mit MG enthielt, die denen der Eichsubstanzen sehr ähnlich waren (Abb. 18), konnte kein gemeinsamer Lauf auf einem Gel durchgeführt werden. Die im Gel mit Coomassieblau angefärbten Proteinbanden wurden zur prozentualen Proteinbestimmung am Densitometer bei 583 nm ausgemessen (Abb. 18).

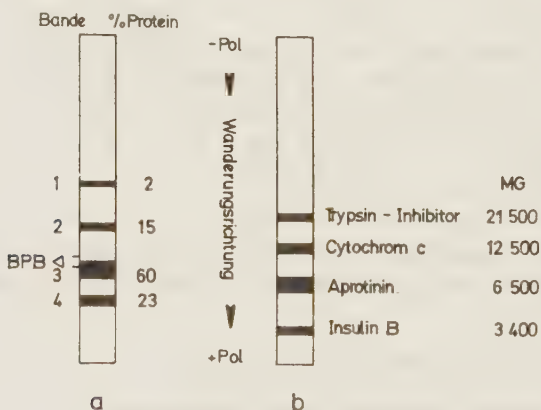


Abb. 18: Mit Coomassieblau angefärbte Proteinbanden der ersten P-2 Fraktion, 10 μ l Δ 15 μ g Protein (a) und der Eichproteine, 40 μ l Δ je 5 μ g Protein (b) nach 3 Std. SDS-Elektrophorese (zur Mobilitätsbestimmung wurden die unteren Kanten der Zonen vermessen)

Tab. 28: MG-Bestimmung der Proteinbanden der ersten P-2 Fraktion nach SDS-Elektrophorese anhand der mit Eichproteinen aufgestellten Eichkurven (Mittelwerte von jeweils insgesamt 7 vermessenen Gelen)

Bandennummer	MG aus Einzelläufen der Eichproteine	MG aus gemeinsamen Lauf der Eichproteine	% Protein der Gesamtmenge
1*	47000	34100	2
2	22000	16400	15
3	10900	9000	60
4	6000	5000	23

*Diese Bande liegt außerhalb der Eichgeraden!

Bei der SDS-Elektrophorese mußte übrigens sehr darauf geachtet werden, daß das Insulin (Kette B) während des Laufs nicht aus dem Gel wandert, da die Bromphenolblaubande hinter dem Aprotinin läuft! Bei der ersten P-2 Fraktion fiel die Bande des Bromphenolblaus fast mit der des Hauptproteins zusammen (Abb. 18). Insgesamt waren die Ergebnisse (= Mobilitäten) sowohl der Eichproteine als auch der ersten P-2 Fraktion sehr gut reproduzierbar und unterlagen nur geringen Schwankungen.

3.2.1.3. Vergleich der Ergebnisse

Will man nun die Ergebnisse der beiden Methoden miteinander vergleichen, so fällt sofort auf, daß der Hauptpeak nach Gelfiltration bei einem MG von <1500 Daltons von der Sephadex-Säule (Abb. 17) eluiert wurde, während sich nach SDS-Elektrophorese für die Hauptbande ein MG von 9000-10900 Daltons (Abb. 18) bestimmen ließ. Übereinstimmung liegt aber vor im prozentualen Proteinanteil des Hauptpeaks (55 %, Abb. 17) als auch der Hauptbande (60 %, Abb. 18), bezogen auf die gesamte in der ersten P-2 Fraktion vorliegende Proteinmenge. Dennoch können diese stark unterschiedlichen MG erklärt werden, wenn man das Vorliegen von Glykoproteinen annimmt. Da bei der Sephadex-Gelfiltration die globuläre Konfiguration der Proteine für das Standardverhalten eine sehr wichtige Rolle spielt, ist es verständlich, daß Glykoproteine, die gestrecktere Strukturen aufweisen, Abweichungen hinsichtlich ihres über Gelfiltration bestimmten MG zeigen (ANDREWS, 1965). Bei der SDS-Elektrophorese hingegen spielt die räumliche Struktur der Substanzen keine

Rolle, da durch das Natriumdodecylsulfat die Proteine und Glykoproteine vor der Auftrennung erst gleichermaßen entfaltet werden. Für das MG von ca. 10000 Daltons der Hauptproteinbande der ersten P-2 Fraktion spricht zudem auch das Ergebnis der Gelfiltration des Rohextraktes über AcA (Abb. 12), wobei für den Peakgipfel der IES-haltigen Fraktion ebenfalls ein MG von ca. 10000 Daltons bestimmt wurde.

Die restlichen nach SDS-Elektrophorese aufgetrennten Proteinbanden (Tab. 28) stimmen aber mit den nach Gelfiltration über G 50 eluierten Peaks (Abb. 17) sowohl vom prozentualen Proteingehalt als auch vom MG her sehr gut überein. So kann Peak 1 (MG >30 000) und Peak 2 (MG = 27 900) die Bande Nr. 1 mit 2 % Protein der Gesamtmenge zugeordnet werden (Tab. 29), obwohl sich ihr MG über SDS-Elektrophorese nicht exakt bestimmen ließ, da es bereits außerhalb der Eichgeraden liegt. Peak 3 (MG = 15900) hingegen muß der Bande Nr. 2 (MG = 16400) entsprechen, ebenso wie Peak 4 (MG = 5800) der Bande Nr. 4 (MG = 5000) zugeordnet werden kann (Tab. 29).

Tab. 29: Vergleich der über SDS-Elektrophorese und Sephadex-Gelfiltration ermittelten MG der aufgetrennten Proteine der ersten P-2 Fraktion

SDS - Elektrophorese			Sephadex G 50 - Gelfiltration		
Bande	MG	%-Protein	Peak	MG	%-Protein
1	>22000	2	1+2	>30000 27900	55
2	16400	15	3	15900	
3	9000	60	5	<1500	
4	5000	23	4	5800	

3.2.2. Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung des 1. Peaks der Biogel P-2 Säule

Ein von der ersten P-2 Fraktion aufgenommenes UV-Spektrum (in bidest. Wasser) zeigte sehr große Ähnlichkeit mit dem des von PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) aus Hafer isolierten "pH = 4,7 Esters", obwohl ihr UV-Spektrum im Gegensatz zu dem hier abgebildeten (Abb. 23) bei 290 nm keine durch IES hervorgerufene Schulter aufweist, was aber mit ihren minimalen IES-Funden in

der "pH = 4,7 Esterfraktion" gut übereinstimmt. Deshalb sollten nun analog ihren Untersuchungen ebenfalls die einzelnen Komponenten dieser ersten P-2 Fraktion genau bestimmt werden, um mit den Ergebnissen eine Summenbilanz aufstellen zu können.

3.2.2.1. Proteinbestimmungen

Zwar war mit Hilfe der Biuretreaktion der Proteingehalt der ersten P-2 Fraktion bereits schon zu 20,1 % bestimmt worden (vgl. 2.2.2.), da aber der Biuretttest nur im Bereich von 1 bis 5 mg Protein linear verläuft, sollte jetzt nach einer Methode gesucht werden, die weniger Protein verbraucht.

Zunächst wurde eine nach LOWRY (1951) modifizierte Mikromethode getestet, wobei im Bereich von 5 bis 30 μ g Protein gearbeitet wird. Diese Bestimmung ergab für die lyophilisierte erste P-2 Fraktion einen Proteingehalt von 10 % des Gesamtgewichtes, was deutlich vom Ergebnis der Biuretmethode mit 20,1 % abweicht (Tab. 30). Nach BRADFORD (1976) soll aber sowohl die Biuretmethode als auch der Lowrytest dem Einfluß von Zuckern und Kohlenhydraten unterworfen sein. Deshalb mußte nach einer weiteren Methode gesucht werden, da ja sowohl über DC (vgl. 3.1.2.2.) als auch PC (vgl. 2.2.2.) in der ersten P-2 Fraktion Zucker nachgewiesen worden waren.

Die nächste Proteinbestimmungsmethode, wobei die Bindung von Coomassieblau ans Protein gemessen wird, wurde nur deshalb gewählt, da hierbei vor allem keine störenden Einwirkungen anderer Substanzen bekannt sind (BRADFORD, 1976). Mit dieser BioRad-Bestimmungsmethode, die mit Mengen von 20 bis 150 μ g Protein auskommt, wurde der Proteingehalt der ersten P-2 Fraktion anhand einer Verdünnungsreihe mit 9,4 % bestimmt (Tab. 30).

Da aber sowohl die angewandte Lowry- als auch BioRad-Methode, die beide übereinstimmende Ergebnisse lieferten, relativ aufwendig auszuführen ist, wurde nun die sehr schnell durchzuführende Trübungsmessung nach TCA-Fällung der Proteine auf Genauigkeit hin überprüft. Mit dieser Methode wurde der Proteingehalt der in Lösung leicht gelblich gefärbten ersten P-2 Fraktion zunächst mit 14,5 % bestimmt. Mißt man aber nach Abzentrifugation der gefällten Proteine die Extinktion der gefärbten, klaren Lösung und korrigiert den Wert der Trübungsmessung damit, so beträgt der Proteingehalt nur mehr 12,2 % des Gesamtgewichtes (Tab. 30).

Tab. 30: Proteinbestimmung der ersten P-2 Fraktion (18,65 mg Δ 5 g Karyopsen) mit verschiedenen Methoden

Methode	Meßbereich /ug	Extinktion d. Messung nm	Proteingehalt der Fraktion	
			mg	Gewichts %
Biuret	1000-5000	540	3,75	20,1
Lowry	5- 30	660	1,865	10,0
BioRad	20- 150	595	1,75	9,4
TCA-Trübung	100-1000	450	2,27	12,2

Übrigens ergab ein Absorptionsspektrum von 340-700 nm des leicht gefärbten Überstandes nach TCA-Fällung und Abzentrifugation der Proteine der ersten P-2 Fraktion, daß ab 520-700 nm die Absorption der gefärbten Lösung weitgehend der Nulllinie entsprach. Deshalb geht bei keiner Messung, außer bei der der Trübung bei 450 nm die Farbe der Lösung in die Proteinbestimmung mit ein.

Nach diesem Vergleich der verschiedenen Proteinbestimmungsmethoden, die alle mehrmals mit derselben ersten P-2 Probe anhand von Verdünnungsreihen durchgeführt worden waren, zeigte das Verfahren, modifiziert nach LOWRY (1951) die geringste Abweichung vom Mittelwert = 10,53 %, der aus allen Bestimmungen außer der der Biuret-Methode errechnet wurde (Tab. 30). Leider stellt diese Methode aber auch die aufwendigste dar. Deshalb wurde bei allen später durchgeführten Proteinbestimmungen die TCA-Trübungsmessung vorgezogen, da diese sich am einfachsten und schnellsten durchführen läßt bei dennoch guten Ergebnissen.

3.2.2.2. Gewichtsmäßige Summenbilanz

Über die DC war ja bereits bekannt, daß der Zuckergehalt der ersten P-2 Fraktion wesentlich höher sein muß als der Proteingehalt (vgl. 3.1.2.2.). Da aber nun eine quantitative Bestimmung aller nach Hydrolyse freigesetzten einzelnen Zuckerkomponenten viel zu aufwendig gewesen wäre, wurde beschlossen, eine quantitative Messung durchzuführen, die auf Vergleich einer der Hauptkomponente der ersten P-2 Fraktion ähnlichen Substanz mit bekanntem, relativ hohem Kohlenhydratanteil beruht. Das Glykoprotein

Ovomucoid schien für diese Vergleichsmessung besonders gut geeignet, da sein MG nur 28000 Daltons und sein Kohlenhydratanteil nach CHATTERJEE u. MONTGOMERY (1962) 21 % beträgt. Deshalb zeichnet sich diese Substanz, ebenfalls wie die Hauptproteinmenge der ersten P-2 Fraktion, auch durch ein Gelfiltrationsverhalten aus, das vom Standardverhalten globulärer Proteine stark abweicht (ANDREWS, 1965).

Über PC (zweidimensional) wurde festgestellt, daß die Zuckerkomponenten des Ovomucoids mit denen der ersten P-2 Fraktion ebenfalls gut übereinstimmen. Die Zucker Xylose, Mannose, Arabinose und Glucose waren in beiden Proben vorhanden; Galaktose und der Alkohol Inosit lagen zusätzlich noch in der ersten P-2 Fraktion vor. Zur Kohlenhydratbestimmung wurde nun nach saurer Hydrolyse zunächst der Zuckergehalt bezogen auf Glucose mit Anthron-Reagenz colorimetrisch (nach SPIRO, 1966) bestimmt und zwar sowohl vom Ovomucoid als auch von der ersten P-2 Fraktion. Da sich beim Ovomucoid der auf Glucose bezogene Zuckeranteil mit 6,6 % errechnete bei einem tatsächlichen Kohlenhydratanteil von 21 % (Fehlerbreite 18,2-25,6 % nach MONTREUIL et al., 1965), mußte der mit 16,5 % bestimmte Zuckeranteil der ersten P-2 Fraktion korrigiert werden, um den Wert des tatsächlichen Kohlenhydratanteils zu erhalten (vgl. II, 13.5.a.). Dieser betrug damit 52,5 % (Fehlerbreite: 46-64 %).

Zählt man nun zur Aufstellung der Summenbilanz der ersten P-2 Fraktion ihren Proteingehalt von 10,53 % (= Mittelwert, Tab. 30) und ihren Kohlenhydratanteil von max. 64 % zusammen, so machen diese beiden Gruppen bereits ca. 75 % des Gesamtgewichts aus. Der IES-Gehalt dieser Fraktion fällt dabei mit 0,06 % kaum ins Gewicht. Um nun die restlichen 25 % aufklären zu können, wurde zunächst einmal der Salzgehalt der ersten P-2 Fraktion quantitativ bestimmt, da die Entsalzung über Säulengelfiltration (vgl. 3.1.1.) nie 100 %ig verläuft.

Die Phosphatbestimmung, durchgeführt anhand einer von FLYNN et al. (1954) modifizierten Methode nach FISKE u. SUBBAROW (1925), ergab dabei einen anorganischen Phosphatgehalt der ersten P-2 Fraktion von immerhin noch 21 %. Damit waren nun die Bestandteile von max. 96 % des Gesamtgewichts der ersten P-2 Fraktion aufgeklärt.

3.2.2.3. Kartierung von zuckerhaltigen Peptiden nach Trypsin- Abbau

Nachdem nun festgestellt worden war, daß der Kohlenhydratgehalt der ersten P-2 Fraktion den Proteingehalt fast um das 6-fache übertrifft, sollte anhand einer zweidimensionalen Auftrennung der tryptischen Peptide der ersten P-2 Fraktion geprüft werden, ob mit Hilfe dieser Fingerprints Zuckerpeptide gefunden werden können, die als erster direkter und eindeutiger Beweis für das Vorkommen von Glykoproteinen gelten würden.

Zur Trypsin-Spaltung wurden etwa 2,5 mg Substanz (erste P-2 Fraktion) eingesetzt. Nach Elektrophorese und Chromatographie ließen sich die Peptide mit Ninhydrin (EASELEY, 1965) und die Zucker mit alkalischem Silbernitrat (TREVELYAN et al., 1950) sichtbar machen. Auf den tryptischen Fingerprints (Abb. 19) konnten nur 8 verschiedene Peptide gefunden werden, wovon sich zwei als Zuckerpeptide identifizieren ließen. Zudem wies das eine Zuckerpeptid Fluoreszenz auf, was auf eine aromatische Komponente schließen läßt (Abb. 19).



Abb. 19: Kartierung der zuckerhaltigen tryptischen Peptide der ersten P-2 Fraktion. (Die Probe wurde stichförmig am Schnittpunkt der Koordinaten aufgetragen)

- : Fluoreszenz unter UV-Licht
- : positive Reaktion der Peptide
- : positive Reaktion der Zucker

3.2.3. Glykoproteinfärbung nach Disc-Elektrophorese der ersten P-2 Fraktion

Da das Vorkommen von Glykoproteinen in der ersten P-2 Fraktion nun eindeutig nachgewiesen war, sollten die mittels Disc-Elektrophorese aufgetrennten Banden dieser Fraktion (Abb. 13a) auf ihre Glykoproteine hin überprüft werden, um das Verhältnis von Protein- zu Glykoproteinbanden ermitteln zu können. Dazu wurde die Anfärbung mit Schiff's Reagenz nach ZACCHARIUS u. ZELL (1969) gewählt, da es hiermit möglich ist, nach Färbung der Glykoproteinbanden anschließend ebenfalls die Proteinbanden mit Coomassieblau sichtbar zu machen. Nach dem Färbeverfahren wiesen aber nur die Vergleichssubstanzen (α -Globulin, Ovalbumin) Glykoproteinbanden auf. Auch nach der darauffolgenden zusätzlichen Coomassieblau-Färbung waren - wieder im Gegensatz zu den Vergleichssubstanzen - in der ersten P-2 Fraktion die Proteinbanden nur mehr ganz schwach zu erkennen. Dieses Ergebnis ließ sich nur erklären durch eine möglicherweise eingetretene Auswaschung der Proteine nach der TCA-Fällung, bei der die Banden jedesmal noch sehr deutlich zu sehen gewesen waren.

Eine Bestätigung dieser Annahme lieferte folgende Beobachtung. Wenn nach der Focussierung der ersten P-2 Fraktion die Gele, in denen die Proteine mittels 20 %iger TCA ausgefällt waren (Abb. 13b), zur Aufbewahrung in dest. Wasser gelegt wurden, so fand bereits innerhalb der nächsten Stunde eine am Densitometer meßbare Farbabnahme fast aller Banden statt (Tab. 31).

Tab. 31: Densitometrische Ausmessung der Gelbanden der focussierten ersten P-2 Fraktion (vgl. Abb. 13b) direkt nach Ausfällen der Proteine mit 20 %iger TCA und 1 Std. später nach Wässern derselben Gele

Bandennummer (Abb. 13b)	Peakfläche der Banden (cm ²)	
	Gel in 20 % TCA	Gel 1 Std. in dest. Wasser
1	2,34	2,18
2	0,90	-
3	0,94	-
4	2,10	1,17
5	4,04	1,03
6	0,96	0,65
7	0,64	0,33
8	0,39	0,40
9	0,89	0,51
10	1,43	1,43

Daraus folgt, daß die in der ersten P-2 Fraktion vorliegenden wasserlöslichen Proteine in verdünnter wäßriger TCA ebenfalls löslich sind. HOCHSTRASSER (1962) konnte aus der Albuminfraktion von Gerste Glykoproteine isolieren, die sich in 5 %iger TCA lösen.

Eine Abänderung des Färbeverfahrens, z.B. Fällung mit 20 %iger TCA und Waschen der Gele anstelle mit dest. Wasser jedesmal nur mit 10 %iger TCA, lieferte aber auch nur undeutliche Banden, da keine vollständige Entfärbung der Gele mehr möglich war, so daß auf diesen Farbnachweis von Glykoproteinbanden nach Disc-Elektrophorese der ersten P-2 Fraktion verzichtet werden mußte.

3.2.4. Vergleichende Untersuchungen des entsalzten ersten und zweiten P-10 Peaks

Das beste Resultat bezüglich der weiteren Auftrennung der ersten P-2 Fraktion, deren Glykoproteine sich nicht an Con A Sepharose binden ließen, war mittels Gelfiltration über Biogel P-10 erreicht worden (vgl. 3.1.7.). Da aber aufgrund der MG-Bestimmung (vgl. 3.2.5.1.) die Vermutung nahe lag, ebenfalls wie bei der SDS- auch bei allen weiteren mit der ersten P-2 Fraktion durchgeführten Elektrophoresen (Disc-, Focussierung) immer nur die Proteine, die im IES-freien 1. Peakbereich der P-10 Säule (Abb. 20) vorliegen, aufgetrennt und deren Banden angefärbt zu haben und da die IES hingegen aber nur im 2. Peakbereich der P-10 Säule zu finden ist (vgl. 3.1.5.), war es unbedingt notwendig, den 1. und den 2. Peak der P-10 Säule vergleichend zu untersuchen. Für diese Untersuchungen mußten aber beide Fraktionen zunächst über eine Biogel P-2 Säule (2,4/70 cm) mit bidest. Wasser entsalzt und anschließend lyophilisiert werden.

Nach Disc-Elektrophorese pH = 8,8 sowohl der ersten P-2 Fraktion zum Vergleich als auch der beiden P-10 Peakfraktionen, wobei die Peakeluate mit einem MG von 4800 und 2000 Daltons (Abb. 20) jeweils getrennt aufgetragen wurden, konnte anhand der mit Coomassieblau angefärbten Proteinbanden eindeutig gezeigt werden, daß die 2. Bande (Abb. 13a) dem Peak bei 10200 Daltons (Abb. 20), die 3. Bande (Abb. 13a) dem bei 4800 Daltons (Abb. 20) und die 6. Bande (Abb. 13a) dem bei 2000 Daltons (Abb. 20) entspricht. So wies die 1. Peakfraktion der P-10 Säule (Abb. 20) nach Disc-Elektrophorese bis auf die 6. Bande (Abb. 13a) tatsächlich alle Proteinbanden der ersten P-2 Fraktion auf (Abb. 13a), während

in der 2. IES-haltigen Peakfraktion der P-10 Säule (Abb. 20) außer der nur hier erscheinenden 6. Bande (MG = 2000 Daltons) keine weiteren Banden nachgewiesen werden konnten. Da entweder die Proteinmenge pro Gelröhrchen zu gering war oder möglicherweise die im zweiten P-10 Peak vorliegenden Polypeptide mit relativ kleinem MG (< 1350 Daltons) nach Elektrophorese im Gel nicht ausgefällt und damit nach Anfärben auch nie sichtbar wurden, sollte nun der Proteingehalt quantitativ bestimmt werden.

Zur Proteinbestimmung wurde zunächst wieder die 1. und 2. Peakfraktion der P-10 Säule (Abb. 20) über Biogel P-2 (2,4/70 cm) entsalzt, wobei nach Gefriertrocknung die 1. Peakfraktion aus einer weißlichen, voluminösen Substanz bestand, während der salzfreie Teil der 2. Peakfraktion, die sich nur unvollständig entsalzen ließ (vgl. 3.1.6.), sich aus bräunlichen, feinen Stäubchen zusammensetzte, die an der Luft sofort Wasser zogen und verklebten. Zur Proteinbestimmung wurde die Trübungsmessung nach TCA-Fällung verwendet. Damit ergab sich für die entsalzte, farblose erste P-10 Peakfraktion ein Proteingehalt von 26 %, während der bräunlich gefärbte, salzfreie Teil der zweiten P-10 Peakfraktion nach Extinktionskorrektur (vgl. 3.2.2.1.) einen Proteingehalt von nur ca. 2 % des Gesamtgewichtes aufwies (Tab. 32).

Tab. 32: Proteinbestimmung (TCA-Trübungsmessung) der entsalzten ersten und zweiten P-10 Fraktion (auf P-10 Säule aufgetragene Menge Δ erste P-2 Fraktion von 10 g Karyopsen)

Fraktion (Abb. 20)	Entsalzung über P-2	salzfreie Substanz	Trockengew. mg	Proteingehalt	
				mg	Gewichts%
erste P-10	vollkommen salzfrei	weißlich, voluminös	7,8	2,00	26,0
zweite P-10	salzfreier Anteil	bräunliche Brösel	30,0	0,56	1,8
	salzhaltiger Anteil		2003		

Da die zweite P-10 Fraktion (salzfreie Teil) im Vergleich zur entsalzten ersten P-10 Fraktion einen sehr geringen Proteinanteil aufwies (Tab. 32) und die Beschaffenheit ihrer Substanz auf Zuckerkomponenten schließen ließ, wurde sowohl mit dieser, aber auch mit der ersten P-10 Fraktion nach saurer Hydrolyse über PC (ein- und zweidimensional) eine qualitative Zuckerbestimmung durchgeführt. Entgegen den Erwartungen unterschieden sich aber die beiden untersuchten Fraktionen hinsichtlich ihrer Zucker nicht. In beiden wurde Glucose als häufigste Komponente gefunden, daneben Galaktose, Arabinose, Xylose und der Alkohol Inosit, die aber in jeweils unterschiedlichen Mengen auftraten. Wiederum können diese Zucker Bestandteile von Glykoproteinen darstellen (PIGMAN u. HORTON, 1970). In der ersten P-10 Fraktion kann z.B. aufgrund der durchgeführten Untersuchungen dem Peak mit einem MG von ca. 10000 (Abb. 20) = 2. Proteinbande nach Elektrophorese (Abb. 13a) eindeutig ein Glykoprotein zugeordnet werden (vgl. 3.2.5.1. und 3.2.1.3.).

3.2.5. Molekulargewichtsbestimmung der IES-Verbindung III mittels verschiedener Gelchromatographien

Zur Charakterisierung der IES-Verbindung III war es unbedingt notwendig, ihr genaues MG zu bestimmen. Dazu wurden diesmal bei den verschiedenen Gelfiltrationen immer nur Gele vom Biogel P Geltypus verwendet, da diese eine andere Matrix aufweisen als das Sephadex G 50 Gel. Deshalb sollte zu erwarten sein, daß die von ANDREWS (1965) bei Gelfiltrationen von Glykoproteinen an Sephadexgelen gemachte Beobachtung hinsichtlich ihrer Abweichung vom Proteinstandardverhalten hier nicht gelten muß. Zudem wird dies durch die Aussage von LI (1967) bestätigt, daß z.B. Lectine (= Glykoproteine mit hohem Kohlenhydratanteil) nicht an Biogel P gebunden, also auch nicht verzögert eluiert werden.

3.2.5.1. Gelfiltration über Biogel P-10 der ersten P-2 Fraktion

Mittels Gelfiltration der ersten P-2 Fraktion über Biogel P-10 sollte es nun möglich sein, ein genaues MG der IES-haltigen zweiten P-10 Fraktion (vgl. 3.1.5.) zu erhalten. Nach Eichung der Biogel P-10 Säule, deren Fraktionierungsbereich von 1500 bis 20000 Daltons reicht und damit enger ist als der der Sephadex G 50 Säule (vgl. 3.2.1.1.), ergab sich für den 1. Peakbereich ein

MG von > 20000 bis ca. 4000 Daltons, während der IES-haltige 2. Peak (vgl. 3.1.5.) ein MG von unter 2000 Daltons aufwies. Der 3. Peak lag bereits außerhalb des Eichbereiches (Abb. 20).

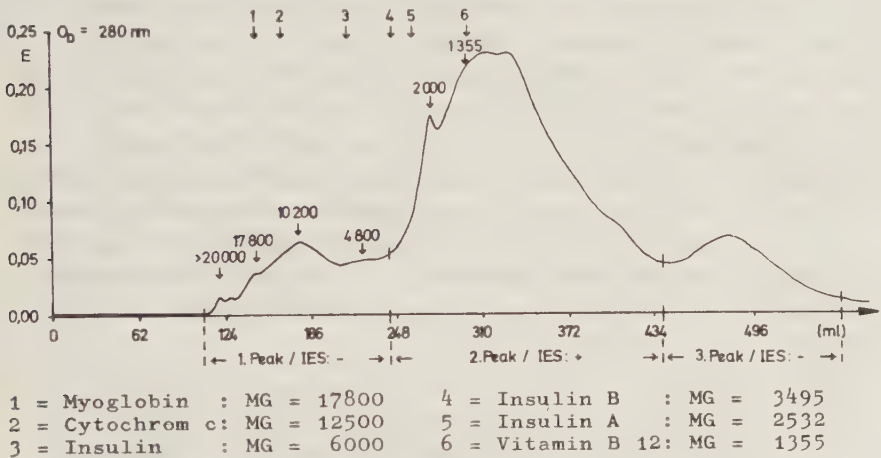


Abb. 20: Gelfiltration der ersten P-2 Fraktion (Δ 7,5 g Karyopsen) über Biogel P-10 bei 4°C
Trennbereich: 1500-20000 Daltons
Säule : 2,3/75 cm
Puffer : 5×10^{-2} M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0
Durchfluß : 31 ml/h

Da bei wiederholten Gelfiltrationen die Peakhöhe bei MG = 2000 Daltons erheblich schwankte, ohne daß sich damit der IES-Gehalt änderte (vgl. 3.1.5.), liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um keine IES-bindende Komponente handeln kann, sondern diese erst mit dem darauffolgenden breiten Peak von der Säule eluiert wird.

Erstaunlicherweise stimmen die nach dieser Gelfiltration der ersten P-2 Fraktion gefundenen MG des 1. Peakbereiches (Abb. 20) sehr gut überein mit den nach SDS-Elektrophorese der ersten P-2 Fraktion ermittelten Werten der aufgetrennten Proteinbanden (Tab. 29). Die Peptide des Hauptpeaks der Biogel P-10 Säule (Abb. 20, zweite P-10 Peak), die ein MG ≤ 2000 aufweisen, waren aber mittels SDS-Elektrophorese nicht erfaßt worden. Dennoch kann dieser IES-haltige zweite P-10 Peak (Abb. 20) hingegen mit dem IES-haltigen Peak nach Gelfiltration der ersten P-2 Fraktion

über Sephadex G 50 (Abb. 17), der ein MG < 1500 aufweist, in etwa verglichen werden, wenngleich auch innerhalb des 2. Peakbereiches der P-10 Säule der Gipfel mit einem MG von 2000 Daltons neu aufgetreten ist (Abb. 20). Dies zeigt aber, daß die Trennleistung des Biogel P-10 Gels besser ist als die des Sephadex G 50 Gels. Zudem trennt sich sowohl über Biogel P-10 als auch bei der SDS-Elektrophorese (Tab. 29, MG = 9000) ein Proteinpeak mit MG = 10200 ab, der bei Gelfiltration über Sephadex G 50 offensichtlich gemeinsam mit dem Hauptpeak (MG < 1500) - ohne sich davon abzutrennen - von der Säule eluiert worden ist (Abb. 17). Dieses unterschiedliche Gelfiltrationsverhalten läßt sich nur, wie schon früher vermutet wurde (vgl. 3.2.1.3.), mit dem Vorliegen eines Glykoproteins mit MG ca. 10000 Daltons erklären.

3.2.5.2. Gelfiltration über Biogel P-4 der salzfreien zweiten P-10 Fraktion nach Con A-Fällung unter Zusatz von Hydrochinon

Nach Con A-Fällung mit IES-haltigen Lösungen unter Zusatz von Hydrochinon ließ sich die IES-Verbindung III immer nur im Überstand finden (vgl. 3.1.8.2.), während im abzentrifugierten Rückstand nur Zucker-Con A-Komplexe vorliegen können, da sich nach Gelfiltration des IES-haltigen Überstandes das Elutionsprofil der Biogel P-10 Säule im 2. IES-haltigen Peakbereich durch diese Con A-Fällung nicht veränderte (vgl. 3.1.8.3). Die weitere Auftrennung dieser salzfreien zweiten P-10 Fraktion gelang anschließend über Biogel P-4 (vgl. 3.1.9.), dessen Fraktionierungsbereich von 800 bis 4000 Daltons reicht. Zur Charakterisierung des IES-haltigen Bereiches dieser P-4 Säule (vgl. 3.1.9.) wurde nun eine MG-Bestimmung durchgeführt (Abb. 21).

Aufgrund der gleichmäßigen Mengenverteilung der gebundenen IES (Verbindung III) auf Peak 3 und 4 (vgl. 3.1.9.) konnte nach Eichung der Säule (Abb. 21) gefolgert werden, daß wahrscheinlich nur der Peak mit einem MG von 1200 Daltons mit der gefundenen IES-Verteilung zu korrelieren ist. Der Peak mit einem MG von 1450 Daltons scheint dabei den breitgezogenen IES-haltigen zu überlagern (Abb. 21).

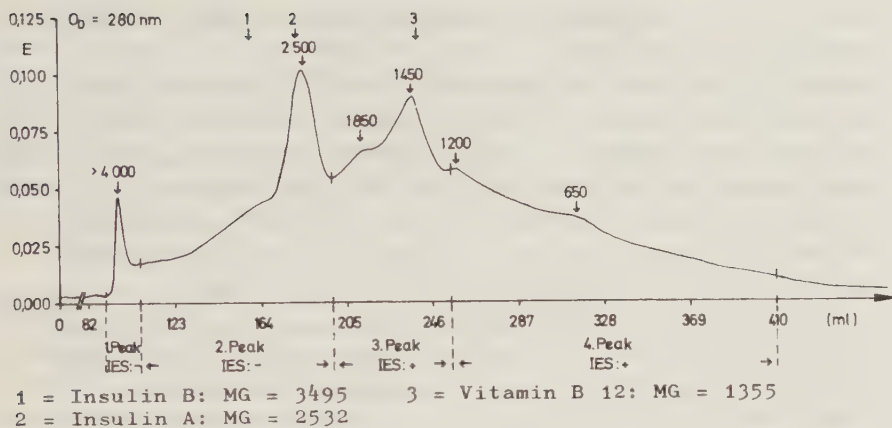


Abb. 21: Gelfiltration des salzfreien zweiten P-10 Peaks nach Con A-Fällung mit Hydrochinon ($\hat{\Delta}$ 5 g Karyopsen) über Biogel P-4 (200-400 mesh) bei 4°C
 Trennbereich: 800-4000 Daltons
 Säule : 2,6/65 cm
 Puffer : 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0
 Durchfluß : 20,5 ml/h

Vergleicht man nun diesen Säulenlauf (Abb. 21) mit dem IES-haltigen Elutionsbereich (Peak 2) der Biogel P-10 Säule (Abb. 20), so bestätigte sich jetzt die früher (vgl. 3.2.5.1.) aufgestellte Vermutung, daß dem Peak mit einem MG = 2000 Daltons ($\hat{\Delta}$ 6. Bande der Abb. 13a, vgl. 3.2.4.) die IES-Verbindung III nicht zugeordnet werden kann. Nach Gelfiltration der salzfreien zweiten P-10 Fraktion (nach Con A-Fällung + Hydrochinon) über Biogel P-4 (Abb. 21) trennt sich dieser Peak (MG = 2500) vollkommen von der IES-enthaltenden Fraktion ab (vgl. 3.1.9.).

3.2.5.3. Gelfiltration über Biogel P-4 der salzfreien zweiten P-10 Fraktion nach Con A-Fällung ohne Hydrochinon

Die weitere Auftrennung der salzfreien zweiten P-10 Fraktion (Con A-Fällung ohne Hydrochinon) war sowohl über Biogel P-2 als auch P-4 versucht worden (vgl. 3.1.10.3.). Bei der Gelfiltration über Biogel P-2 trennte sich im eigentlichen Fraktionierungsbereich der Säule (100-1800 Daltons) nur ein Peak mit MG = 600 Daltons ab, der aber keine IES enthielt. Deshalb mußte zur Auftrennung der salzfreien zweiten P-10 Fraktion (Con A-Fällung: 1 Stunde, ohne Hydrochinon) wieder auf die Biogel P-4 Säule zurückgegriffen werden, wobei nun die gebundene IES (Verbindung III)

gemeinsam mit dem einzigen Zuckerpeak von der Säule eluiert wurde (vgl. 3.1.10.3.).

Um nun das MG sowohl der IES-freien Peaks als auch des IES-haltigen Zuckerpeaks bestimmen zu können, wurde die Biogel P-4 Säule geeicht. Danach ließ sich das MG des hinter dem Ausschlußpeak (>4000 Daltons) von der Säule eluierten Peptids mit 2240 Daltons (Δ 6. Bande der Abb. 13a, vgl. 3.2.4.) und das des nächsten breiteren Peaks mit 1412 Daltons bestimmen (Abb. 22). Vergleicht man nun dieses Elutionsprofil ($E = 280$ nm, Abb. 22) mit dem der Abb. 21, so findet man eine gute Übereinstimmung hinsichtlich der MG der eluierten Peaks, obwohl diesmal (Abb. 22) ihre Abtrennung voneinander schlechter verlaufen war.

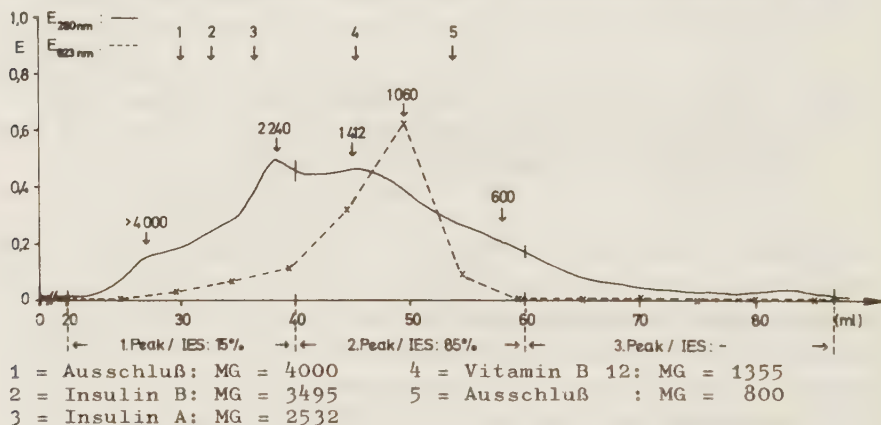


Abb. 22: Gelfiltration des salzfreien zweiten P-10 Peaks (Δ 5 g Karyopsen) nach Con A-Fällung (1 Stunde, ohne Hydrochinon) über Biogel P-4 (100-200 mesh) bei 4°C; —: $E = 280$ nm, x---x: $E = 623$ nm (x = Zuckerbestimmung mit je 0,4 ml)
Trennbereich: 800-4000 Daltons
Säule : 1,0/75 cm
Puffer : 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0
Durchfluß : 4,0 ml/h

Aufgrund von IES-Bestimmungen war übereinstimmend gefunden worden, daß sowohl der Peak mit einem MG = 2500 Daltons (Abb. 21) als auch mit MG = 2240 Daltons (Abb. 22) jeweils keine IES aufweisen, sondern die IES-Verbindung III immer erst danach von der Säule eluiert wird. Eine eindeutige Zuordnung der gebundenen IES gelang aber erst nach der letzten durchgeführten Gelfiltration über Biogel P-4 (vgl. 3.1.10.3.), wobei die ge-

bundene IES gemeinsam mit dem einzigen Zuckerpeak von der Säule eluiert wurde, dessen Maximum sich bei einem MG von ca. 1060 Daltons finden ließ (Abb. 22). Da aber zwischen den Fraktionen 45 und 50 (Abb. 22) keine weitere Zuckerbestimmung durchgeführt worden war, kann der Peakgipfel der Anthron-positiven Substanz somit durchaus zwischen 1400 und 1100 Daltons liegen.

Anhand früherer Ergebnisse läßt sich eine Co-Chromatographie der Verbindung mit einem MG von 600 Daltons mit der gebundenen IES sicher ausschließen (vgl. 3.1.10.3.). Ebenso kommt aufgrund der IES-Verteilung (vgl. 3.1.9.) die Verbindung mit einem MG von ca. 1450 Daltons als Bindungspartner der IES nicht in Frage (vgl. Abb. 21 und 22). Deshalb kann in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Abb. 21 (vgl. 3.2.5.2.) lediglich der Peak mit einem MG von 1200 Daltons sowohl mit dem Zuckerpeak (MG = 1100-1400 Daltons), als auch mit der IES-Verteilung in einen direkten Bezug gebracht werden.

Diese letzten Ergebnisse (Abb. 22), aus denen die Co-Chromatographie der IES mit Zuckern (Oligosacchariden) hervorgeht, liefern ebenso wie das Verhalten der gebundenen IES (Verbindung III) gegenüber der Kohle-Celite-Säule (vgl. 3.2.6.) den Beweis für das Vorliegen einer niedermolekularen zuckerhaltigen IES-Verbindung III. Die ständige Co-Chromatographie der bei 280 nm absorbierenden Substanz mit MG ca. 1200 Daltons mit der gebundenen IES kann dagegen allein jedoch nicht als eindeutiger Beweis für eine Bindung gelten.

Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Untersuchungen konnten PERCIVAL u. BANDURSKI (1976), die ebenfalls aus Hafermehl eine IES-Esterfraktion isolierten und auch charakterisierten, keine Bindung der IES an Zucker nachweisen, so daß sie nur aufgrund von Co-Chromatographie folgerten, eine IES-Glykoproteinfraktion vorliegen zu haben.

3.2.6. Adsorptionschromatographie der IES-Verbindung III an einer Kohle-Celite-Säule

Nach IHL (1976) adsorbiert freie IES im Gegensatz zum makromolekular, protein-gebundenem Hormon an Aktivkohle. Nach WHISTLER u. DURSO (1950) ist es möglich, an eine Kohle-Celite-Säule gebundene Oligosaccharide mittels linearem Alkoholgradienten wieder zu eluieren. Unter der Voraussetzung, daß die niedermolekulare IES-Verbindung III an Aktivkohle gebunden wird, müßte so -

nur aufgrund eines Zuckeranteils (vgl. 3.2.5.3.) - die adsorbierte IES von der Aktivkohle mit Hilfe von Alkohol wieder eluiert werden können. Hierdurch könnte ein eindeutiger Nachweis für einen Zuckeranteil der IES-Verbindung III erbracht werden. Zugleich würde mit dieser Methode eine völlige Entsalzung der zweiten P-10 Säulenfraktion möglich sein und somit dieses Verfahren eine Alternative zur Entsalzung dieser Fraktion mittels Gelfiltration über Biogel P-2 darstellen, wobei der IES-Verlust immer relativ hoch ist (vgl. 3.1.6.1.).

Um die Adsorption der niedermolekularen IES-Verbindung III selbst an Aktivkohle erst einmal zu testen, wurde im Vorversuch mit einem Kohlefilter gearbeitet, auf den sich zunächst der salzfreie Teil der zweiten P-10 Fraktion auftragen ließ. Anschließend wurde sowohl die Waschwasserfraktion als auch die 50 %ige Äthanolfraktion auf IES untersucht. Da im Wasser - trotz bester Löslichkeit der IES-haltigen Verbindung III darin - keine IES zu finden war, mußte daraus gefolgert werden, daß die IES-Verbindung III an Aktivkohle adsorbiert, was durch den Wiederfund von gebundener IES in der Äthanolfraktion bestätigt wurde.

Nachdem durch diesen Vorversuch sowohl eine Adsorption der IES-haltigen Verbindung III an Aktivkohle als auch deren Ablösung mittels 50 %igem Äthanol gesichert war, konnte das Verfahren auf eine Kohle-Celite-Säule (1:1,5) übertragen werden. Die Hälfte der salzhaltigen zweiten P-10 Säulenfraktion (ca. 100 ml $\hat{=}$ 5 g Karyopsen) wurde jetzt sofort nach der Gelfiltration auf die Kohle-Celite-Säule aufgetragen und die Puffersalze mit bidest. Wasser eluiert. In dieser salzhaltigen Wasserfraktion ließ sich wiederum keine IES nachweisen. Zur Elution der an die Aktivkohle gebundenen zuckerhaltigen Substanzen wurde die Säule anschließend erst mit 50 %igem, dann mit 80 %igem Äthanol gewaschen. Gebundene IES wurde danach nur in der 50 %igen Alkoholfraktion gefunden, wobei nach Abrotieren des Äthanol der gefriergetrocknete Rückstand aus bräunlichen Bröseln bestand und einen IES-Gehalt von nur ca. 20 % der auf die Säule aufgetragenen IES-Menge aufwies. Wahrscheinlich findet dieser große IES-Verlust beim Abrotieren des Äthanol statt, obwohl natürlich die Desorption der IES-Verbindung III von der Aktivkohle ebenfalls sicherlich nicht quantitativ verläuft. An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß freie (authentische) adsorbierte IES weder mit Wasser noch mit Äthanol

(50 %ig) von der Kohle-Celite-Säule eluiert werden konnte. Obwohl dieses Versuchsergebnis, was den IES-Wiederfund in einer salzfreien Fraktion betrifft, unbefriedigend ausgefallen ist, so kann dennoch mit Sicherheit daraus gefolgert werden, daß die IES-bindende Substanz einen Zuckeranteil aufweisen muß, denn nur dadurch konnte die gebundene IES mittels 50 %igem Alkohol wieder von der Kohle-Celite-Säule eluiert werden.

3.2.7. Charakterisierung der IES-Verbindung III mittels UV-Absorption

Nachdem festgestellt worden war, daß Hydrochinon auf die Con A-Komplexbildung nachweislich einen negativen Einfluß ausübt (vgl. 3.1.10.), wurden alle weiteren Fällungen mit IES-haltigen Fraktionen immer ohne Zusatz von Hydrochinon ausgeführt. So zeigt denn auch der Vergleich der beiden DC-Chromatogramme - einmal der salzfreien zweiten P-10 Fraktion (Abb. 16) und zum anderen derselben Fraktion nur mit vorhergehender Auftrennung mittels Con A-Fällung ohne Hydrochinon (vgl. 3.1.10.1.) - sehr deutlich, daß die Fraktion nach Con A-Fällung außer der zuckerhaltigen IES-Verbindung III nur mehr wenig Substanzen aufweisen kann, da sich mit Con A (ohne Hydrochinon) tatsächlich alle in dieser Fraktion vorliegenden Oligosaccharide ausfällen lassen.

Das von dieser entsalzten zweiten P-10 Fraktion nach Con A-Fällung ohne Hydrochinon aufgenommene UV-Spektrum unterscheidet sich kaum von dem der ersten P-2 Fraktion (Abb. 23). Deshalb wurde nun der molare Extinktionskoeffizient von IES bestimmt, um anhand dieses Wertes sowie der bekannten IES-Konzentration in den Fraktionen die allein von der vorhandenen, gebundenen IES hervorgerufene Extinktion bei 280 nm ermitteln zu können. Bei einem ϵ_{280} -Wert der IES von 5100 bewirkt somit die IES der zuckerhaltigen Verbindung III in der ersten P-2 Fraktion eine Extinktion (280 nm) von 0,02 und in der zweiten P-10 Fraktion eine Extinktion von 0,11. Da aber die UV-Absorptionsspektren in beiden Fällen (Abb. 23) bei $\lambda = 280$ nm ein wesentlich höheres Maximum aufweisen, folgt daraus, daß an der Ausbildung dieses hohen Extinktionswertes außer der IES noch weitere UV-absorbierende Substanzen beteiligt sein müssen. Anhand der Proteinbestimmung der salzfreien zweiten P-10 Fraktion (Tab. 32)

können Peptide, die bei 280 nm absorbieren, ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich läßt sich deshalb die Extinktion bei 280 nm neben IES auf Phenole zurückführen, die in diesem Wellenlängenbereich (270-320 nm) eine sehr starke UV-Absorption aufweisen.

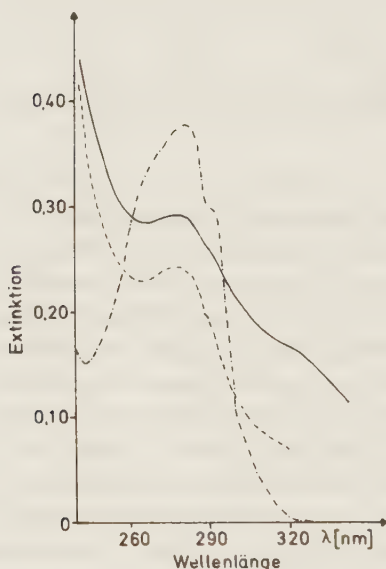


Abb. 23: UV-Absorptionsspektren in bidest. Wasser

- : salzfreie zweite P-10 Fraktion nach Con A-Fällung ohne Hydrochinon; IES: 3,7 $\mu\text{g/ml}$
- : erste P-2 Fraktion; IES: 0,6 $\mu\text{g/ml}$
- : authentische IES: 13 $\mu\text{g/ml}$

Die Co-Chromatographie von gelbgefärbten Substanzen mit der IES-Verbindung III konnte immer wieder beobachtet werden (vgl. z.B. 3.1.7.). Bei allen durchgeführten Gelfiltrationen, als auch Adsorptionschromatographien waren die gebundenen IES-haltigen Eluate immer leicht gelb gefärbt. Im gefriergetrockneten Zustand wiesen deshalb sämtliche IES-haltige Fraktionen immer einen leicht bräunlichen, pulvrigen Anteil auf je nach Stand der Aufreinigung (z.B. zweite P-10 Fraktion, Tab. 32) im Gegensatz zu abgetrennten Fraktionen, die keine gebundene IES enthielten (z.B. erste P-10 Fraktion, Tab. 32). Im lyophilisierten Zustand besteht z.B. die Probe, deren UV-Spektrum hier abgebildet ist (Abb. 23, —), aus stark hygroscopischen, hellbraunen, feinen Stäubchen, die in Lösung die leicht gelbliche Färbung bedingen. Nach PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) soll es sich

bei der gelbgefärbten Substanz, die ebenfalls immer während der Aufreinigung mit ihrer aus Hafer isolierten IES-Esterfraktion co-chromatographierte und auch starke UV-Absorption aufweist, um eine phenolische Komponente handeln.

Die zuckerhaltige IES-Verbindung III und ein bei $E = 280$ nm aufgezeichneter Peak ($MG = 1200$) konnten nach Gelfiltration (Abb. 21) gut in Korrelation zueinander gebracht werden. Eventuell kann dieser Peak nach den vorliegenden Darlegungen auf die phenolische, gelbgefärbte Substanz zurückgeführt werden.

3.2.8. Zusammenfassung der Eigenschaften der IES-Verbindung III und ihres Verhaltens bei verschiedenen Untersuchungen

Beschaffenheit des IES-haltigen Lyophylisats:

Die aufgereinigte, lyophylisierte IES-haltige Fraktion (salzfreier zweiter P-10 Peak, nach Con A-Fällung ohne Hydrochinon, 1 Std., Schema 5, B) besteht aus stark hygroskopischen, hellbraunen Bröseln, die in Lösung eine leicht gelbliche Färbung bedingen.

Lösungsverhalten:

Die niedermolekular gebundene IES ist sehr gut wasserlöslich, löst sich in Aceton/Wassergemisch (1:1) und 50 %igem Äthanol, aber nicht in organischen Lösungsmitteln (z.B. Aceton, wassergesättigtes n-Butanol). Sie löst sich ebenfalls nicht in Fließmittel IX, das zu 64 % Äthanol, zu 22 % Tetra und zu 14 % Wasser enthält. Mit 10 %iger gepufferter NaCl-Lösung (0,01 M Na-Phosphatpuffer) pH = 7,0 verbleibt diese IES-Verbindung III ebenfalls im abzentrifugierten Rückstand.

Stabilität:

Die gebundene IES liegt nur im pH-Bereich zwischen 5-7,5 stabil vor. Aber auch hier tritt in Lösung eine zeitabhängige Zersetzung ein, die aber mittels Hydrochinon (10^{-4} M) weitgehend eingeschränkt werden kann. Mit abnehmendem NaCl-Gehalt (z.B. beim Entsalzen) findet bei dieser in Lösung vorliegenden IES-Verbindung III zunächst eine Abspaltung und danach sogar ein Abbau oder eine Zerstörung der freien IES statt. Auch während

Dialyse zersetzt sich diese IES-Verbindung III sehr schnell. PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) fanden ebenfalls, daß die veresterte IES aus Haferkörnern sich durch große Instabilität auszeichnet und daher eine Isolierung der gebundenen IES immer mit sehr hohen Verlusten verbunden ist.

Bindung an Ionenaustauscher:

Weder an Anionen- noch Kationenaustauschergelen war bei verschiedenen pH-Werten (pH = 4 bis 8) eine Bindung der niedermolekularen IES-Verbindung III möglich.

DC-Chromatographie:

Obwohl in Fließmittel IX (vgl. 6.4.) sowohl freie IES ($R_f = 0,9$) und der IES-Serylester ($R_f = 0,85$) als auch Zucker aus 4 Einheiten ($R_f = 0,54$) wandern, bleibt die IES-Verbindung III am Start sitzen. Dieser Startfleck färbt sich aber immer, selbst nach Con A-Fällung (ohne Hydrochinon) für Zucker positiv an, wobei hier aufgrund der zuckerspezifischen Farbreaktion des Startflecks (gelbbraun) mit Orcin/ H_2SO_4 maximal 3 verschiedene Zuckerkomponenten (Glucose, Galaktose, Inosit) gefunden werden konnten.

Gelfiltration:

Bezüglich des MG der IES-Verbindung III wurden leicht uneinheitliche Ergebnisse erhalten, wahrscheinlich bedingt durch die unterschiedliche Aufreinigung der gebundenen IES: Ultrogel AcA 54 (6000-70000): ca. 10000 Daltons; Sephadex G 50 (1500-30000): < 1500 Daltons; Biogel P-10 (1500-20000): < 2000 Daltons; Biogel P-4 (800-4000): 1100-1400 Daltons.

Die gebundene IES wurde dabei immer in einem breitgezogenen, schlecht abgetrennten Peak eluiert, nie in einer scharfen, begrenzten Zone. Die Auftrennung mittels Gelfiltration gelingt überhaupt nur, wenn von Gelen mit der größeren Ausschlußgrenze zu Gelen mit einer niederen Grenze successive übergegangen wird. Diese Methode steht im Gegensatz zum üblichen Proteinauftrennungsverfahren. Anhand der IES-Verteilung könnte der zuckerhaltige P-4 Säulenpeak, der gemeinsam mit der gebundenen IES von der Säule eluiert wird, dem Peak der P-4 Säule mit einem MG von 1200 Daltons zugeordnet werden, da sowohl der Zucker als auch diese (phenolische?) Komponente jeweils in einem breiten Peak eluiert werden.

Elektrophoretische Auftrennung:

Nach der analytischen Disc-Elektrophorese der IES-haltigen Fraktion (salzfreier zweiter P-10 Peak) kann nur eine einzige Peptidbande mit einem MG von ca. 2000 Daltons angefärbt werden. Eventuell färben sich Peptide mit einem MG $\leq$ 2000 Daltons mit Coomassie nicht mehr an, oder sie sind während der Elektrophorese bereits aus dem Gel gewandert.

Bei der präparativen Elektrophorese war wegen der Verschmierung der IES über den Zuckergradienten hinweg keine Zuordnung zu einer Protein- oder Peptidbande möglich. Entweder wurde die IES während des Elektrophoreselaufes abgespalten oder aber die IES-Verbindung III wandert wegen ihres Zuckeranteiles nicht in einer eng begrenzten Zone.

Kohle-Celite-Säule:

Die niedermolekulare IES-Verbindung III wird an die Säule gebunden. Nur aufgrund eines Zuckeranteils ist die Desorption der gebundenen IES von der Säule mit 50 %igem Äthanol möglich, wobei aber nur 20 % der IES-Verbindung III wiedergefunden werden können.

Con A und Con A-Sepharose Säule:

Die zuckerhaltige IES-Verbindung III wird nicht an die Con A-Sepharose Säule gebunden. Sie geht auch keine Komplexbildung mit freiem Con A ein. Deshalb weist sie keine D-Glucosyl- oder sterisch verwandte Reste auf mit freien Hydroxylgruppen an C₃, C₄ und C₆ des Zuckerringes, da sowohl die α - als auch die entsprechende β -Form - wenn auch schwächer - binden würde (GOLDSTEIN et al., 1965, OGATA et al., 1975).

Co-Chromatographie:

Die IES-Verbindung III wird von allen Säulen immer gemeinsam mit einer gelbgefärbten, UV-absorbierenden Substanz eluiert. Nach PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) handelt es sich hierbei um eine phenolische Komponente. Von FAUSCH et al. (1963) wird die Verknüpfung von Phenolen mit einem Glykoprotein aus Weizenendosperm beschrieben, wobei das Absorptionsspektrum dieser Verbindung (KÜNDIG et al., 1961) dem der niedermolekular gebundenen IES ähnelt.

IV. D I S K U S S I O N

AVERY et al. (1941) bestimmten den IES-Gehalt von Haferkörnern (Sorte: Victory) mit Hilfe des Avena-Krümmungstestes, wobei sie an freier IES 0,4 mg/kg Körner und 9,6 mg/kg Körner alkali-labile IES fanden. PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) konnten anhand ihrer Isotopen-Verdünnungsmethode bei entspelzten Avena-Körnern (= Karyopsen, Sorte: Rodney) 5,5 % (= 0,44 mg/kg Mehl) freie und 94,5 % (= 7,6 mg/kg Mehl) estergebundene IES nachweisen, was nach Korrektur unter Berücksichtigung des Spelzengewichts einer Menge von 5,4 mg/kg Körner gebundener IES entspricht. Da dieser Wert deutlich unterhalb der von AVERY et al. (1941) bestimmten IES-Menge liegt, führen PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) die verschiedenen Ergebnisse auf die unterschiedlichen Hafer-sorten zurück. Diese Annahme kann durch eigene Untersuchungen bestätigt werden, wobei festgestellt wurde, daß der IES-Gehalt in Haferkörnern stark schwanken kann, je nachdem, welche Sorte oder aber auch Ernte untersucht wird.

In 100 g Körnern (*Avena sativa* L.) der Sorte Delphin, Ernte 1973 ließ sich z.B. eine IES-Gesamtmenge von $1,77 \pm 0,14$ mg finden (ZIMMERMANN et al., 1976), bei der Sorte Husar, Ernte 1974 hingegen eine IES-Gesamtmenge von $2,58 \pm 0,21$ mg. Entspelzte man diese Hafersorte (Husar, Ernte 1974), so betrug die IES-Gesamtmenge in 75 g Karyopsen (Δ 100 g Körnern) nur mehr $1,53 \pm 0,12$ mg (Tab. 2), woraus ersichtlich wird, daß auch in den Spelzen IES vorhanden sein muß. Die gleiche Sorte (Husar), aber Ernte 1975 ergab in 75 g Karyopsen (Δ 100 g Körnern) nur mehr eine Gesamtmenge an IES von $1,3 \pm 0,10$ mg. Obwohl diese alle über die DC-Methode (ZIMMERMANN u. RÜDIGER, 1976) ermittelten IES-Bestimmungen an Hafer stark abweichende Werte lieferten sowohl vom Ergebnis der Arbeitsgruppe um AVERY (1941) als auch vom IES-Gehalt, den PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) im Hafermehl bestimmten, so kann dennoch an der Genauigkeit der hier gemachten Angaben nicht gezweifelt werden, da sowohl mittels Biotest (Koleoptilzylindertest) als auch GC-Nachweis immer mit der DC-Methode exakt übereinstimmende Ergebnisse erhalten wurden. Aber nicht nur die Hafersorte und das Erntejahr wirken sich auf den IES-Gehalt aus, auch das Alter der Samenkörner selbst spielt eine entscheidende Rolle. Deshalb ist es durchaus verständlich,

daß Untersuchungen an unterschiedlichen Haferkörnern bezüglich ihres IES-Gehaltes nur schwer miteinander vergleichbar sind. JUEL hat bereits 1941 sowohl bei Mais als auch bei Hafer eine Abnahme des gesamten Auxin-Gehaltes in Samenkörnern während der Lagerung beobachtet. HEMBERG (1955) konnte an Mais bereits nach einem Zeitraum von 4 Monaten eine Abnahme der gebundenen IES feststellen, während dagegen die Menge an freier IES konstant blieb.

Im Verlauf der Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit mit der Hafersorte Husar, Ernte 1974 ergab sich nach Hydrolyse der Karyopsen im Frühjahr 1975 ein IES-Gehalt von $1,53 \pm 0,12$ mg/100 g Körner, wobei die freie IES mit 57 ± 5 μ g/100 g Körner (= 3,7 %) bestimmt wurde (Tab. 2). Zwei Jahre später - im Frühjahr 1977 - betrug die Gesamtmenge an IES in den entspelzten Haferkörnern nur mehr 948 ± 76 μ g/100 g Körner, während sich die Menge an freier IES immer noch mit 48 ± 4 μ g/100 g Körner (= 5,1 %) ermitteln ließ. Bei der Lagerung der Haferkörner über 2 Jahre hinweg waren also fast 40 % der gebundenen IES abgebaut worden, aber der Gehalt der freien IES war - in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von HEMBERG (1955) an Mais - während dieser Zeit konstant geblieben. Noch drastischer kann man diese Abnahme der gebundenen IES - bedingt durch Lagerung - an Karyopsen verfolgen. Hebt man entspelzte Haferkörner im Labor im Dunkeln auf, so ist bereits nach 4 Wochen eine deutliche Verringerung der IES-Menge festzustellen. Damit in Übereinstimmung steht ebenfalls die Beobachtung, daß nach Methanolextraktion der freien IES die gebundene IES im Rückstand während des Trocknungsvorganges an der Luft bei Raumtemperatur im Dunkeln abgebaut wird. So ließen sich z.B. nach Methanolextraktion im Rückstand, der 8 Tage lang getrocknet wurde, nur mehr 70 % der ursprünglich vorhandenen Menge an gebundener IES nachweisen (Tab. 1, 2). HEMBERG (1955) war es aufgrund seiner Ergebnisse an Maiskörnern nicht möglich, die Abnahme der gebundenen IES während der Lagerung mit dem Wasserverlust der Samenkörner zu erklären. Deshalb bleibt möglicherweise eine höhere Rate an Sauerstoffaufnahme sowohl bei entspelzten Haferkörnern als auch bei älteren, zugunsten höherer Permeabilität anatomisch veränderten Samenkörnern zu diskutieren, wobei der Abbau der gebundenen IES mit der erhöhten Sauerstoffzufuhr einhergehen müßte.

Diese Instabilität der gebundenen IES läßt sich aber nicht nur während der Lagerung der Haferkörner beobachten, sondern auch während Extraktion und Aufreinigung IES-haltiger Fraktionen. So konnte ZIMMERMANN (1978) mit unterschiedlichen Extraktionsverfahren zwar die freie IES aus Haferkaryopsen in jedem Fall quantitativ extrahieren, hingegen ließ sich die gebundene IES immer nur bis zu maximal 75 % wiederfinden. Deshalb führte er diesen IES-Verlust auf Zerstörung der gebundenen IES während der Extraktion zurück. In Übereinstimmung mit diesen Angaben konnte in der vorliegenden Arbeit nach NaCl-Extraktion der Haferkaryopsen die freie IES ebenfalls quantitativ extrahiert werden, während sich die gebundene IES, verteilt auf Überstand und Rückstand, nur mehr mit 61 % finden ließ. PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) hatten bei der Isolierung ihrer IES-Esterfraktion aus Hafermehl ebenfalls mit großen IES-Verlusten zu kämpfen, da sie immer wieder beobachten mußten, daß sich Indol-Verbindungen im Rohextrakt gegenüber Licht und Oxidantien sehr labil verhalten, selbst auch noch, wenn diese bereits teilweise gereinigt und konzentriert vorliegen. Aufgrund dieser sehr leichten Spaltbarkeit der gebundenen IES läßt sich bereits vermuten, daß in Haferkörnern die IES über eine labilere Esterbindung und nicht über eine stabilere Peptidbindung verknüpft vorliegen muß. So fanden auch PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) in entspelzten Avena-Körnern nur Spuren von peptidgebundener IES. 1977 bestimmten BANDURSKI u. SCHULZE sowohl den veresterten als auch den peptidgebundenen IES-Gehalt in entspelzten Haferkörnern, wobei sie aber nur 7,62 mg/kg Mehl veresterte IES und keine peptidgebundene IES nachweisen konnten.

Zwar liegt daher nach BANDURSKI u. SCHULZE (1977) in entspelzten Haferkörnern nur estergebundene IES vor, jedoch konnte ZIMMERMANN (1978) aufgrund unterschiedlicher Löslichkeit zeigen, daß sich diese gebundene IES auf mindestens 2 verschiedene IES-Verbindungen verteilen muß. Auch PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) konnten ihre mit 50 %igem Aceton extrahierte IES-Esterfraktion aus Hafermehl durch Ionenaustauscherchromatographie in 2 IES-enhaltende Fraktionen auftrennen, dadurch daß bei pH = 3 1/3 ihrer IES-Ester nicht, 2/3 aber an SP-Sephadex gebunden wurden. Aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Extraktion gebundener IES sowie deren weitere Anreicherung kann sogar gefolgert werden, daß in Haferkaryopsen insgesamt mindestens 4 verschiedene IES-Verbindungen (I, II, III und IV, Schema 6, S.153) vorliegen müssen.

Mittels 10 %iger NaCl-Lösung ließ sich so aus dem Karyopsenmehl eine salzlösliche IES-haltige Proteinfraction isolieren, die ca. 50 % der gebundenen IES enthielt. Während ZIMMERMANN et al. (1976) aufgrund eines 1:5 Verhältnisses des Haferkörnergewichts zum Puffervolumen nur 3 % der gebundenen IES im NaCl-Pufferextrakt vorliegen hatten, konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß sich ab einem 1:10 Verhältnis (Karyopsen in g: Puffervolumen in ml) maximal ca. 50 % der gebundenen IES extrahieren lassen (Tab. 13). Diese 1:1 Verteilung der gebundenen IES auf den salzlöslichen Überstand sowie unlöslichen Rückstand nach NaCl-Extraktion der Haferkaryopsen (Tab. 12, 15) stimmt übrigens mit den nach einem anderen Extraktionsverfahren gewonnenen Ergebnissen von ZIMMERMANN (1978) gut überein, der ebenfalls die gebundene IES aus Haferkaryopsen durch Extraktion zu etwa gleichen Teilen auf 2 verschiedene Proteinfractionen verteilen konnte, die er aufgrund ihrer Löslichkeit der Gruppe der Gluteline und der Albumine zuordnete.

In Übereinstimmung sowohl mit ZIMMERMANN (1971), der den Hauptanteil der löslichen IES-Proteine im NaCl-Pufferextrakt bei einer Ammonsulfatsättigung von 20-50 % ausfällen konnte, als auch mit KARL (1974), der bei einer Sättigung von 40-60 % an Ammonsulfat die meiste IES im Niederschlag fand, konnten 68 % der löslich gebundenen IES nach fraktionierter Fällung bei einer Sättigung an Ammonsulfat von 20-60 % (Tab. 14) abgetrennt werden. Nach der mit dieser Fraktion durchgeführten Gelfiltration mit 10^{-3} M Puffer konnte nur im 1. Peak - allerdings mit einem 59 %igen Verlust - gebundene IES (I, Schema 6) gefunden werden, wobei diesem die von KARL (1974) isolierte IES-haltige Proteinfraction mit einem MG = 36000 Daltons zugeordnet werden könnte.

Während der Extraktion und Anreicherung zeichneten sich diese IES-Proteine durch eine ausgeprägte Instabilität aus, da bereits nach der NaCl-Extraktion ein 39 %iger Verlust der gebundenen IES verzeichnet werden mußte und bei der fraktionierten Ammonsulfatfällung des NaCl-Pufferextraktes nochmals 51 % der löslich gebundenen IES irreversibel geschädigt wurden. Auch nach Auftrennung der 20-60 % Ammonsulfatfraktion mittels Gelfiltration konnte neben Freisetzung von IES (8 %) nur mehr 41 % der gebundenen IES gefunden werden. Diese Beobachtung steht wiederum in Übereinstimmung mit den Befunden von ZIMMERMANN (1971), dem eine Fraktionierung der mit Ammonsulfat gefällten

IES-haltigen Proteine des NaCl-Pufferextraktes sowohl über G 50 als auch Ionenaustauscher wegen Freilegung der gebundenen IES nicht gelang. KARL (1974) konnte sogar nach Auftrennung der mit Ammonsulfat gefällten IES-haltigen Proteinfraction mittels präparativer Focussierung als auch nach Gelfiltration zum Teil gar keine IES mehr finden.

Nach HAMILTON et al. (1961) ist eine enzymatische Hydrolyse der IES-Ester durchaus möglich. BANDURSKI u. SCHULZE (1974) konnten mit Hilfe von IES-Inositol-Estern eine Freisetzung der IES während der Extraktion nachweisen, die sie auf eine enzymatisch katalysierte Hydrolyse des labilen Komplexes zurückführten. UEDA u. BANDURSKI (1969) konnten authentische IES, die sie vor der Extraktion zusetzten, aufgrund einer teilweise IES-Destruktion nur mit 21-35 %igem Verlust wiederfinden. Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen, daß mit Ascorbinsäure, die bei der Extraktion der löslich gebundenen IES aus Haferkaryopsen dem Puffer zugesetzt wurde, der oxidative Abbau der IES weitgehend gehemmt werden kann. Der enzymatische hydrolytische Abbau der gebundenen IES dagegen läßt sich mit PMSF, das ebenfalls bei der Extraktion zugesetzt wurde, nur teilweise unterbinden.

Die weitere Auftrennung der bei einer Ammonsulfatsättigung von 20-100 % ausgefällten IES-Proteine des NaCl-Extraktes mittels Gelfiltration lieferte bei Verwendung eines 10^{-2} M Puffers 2 IES-haltige Peakfraktionen (I, II, Schema 6) (1. Peak: 38 % IES, 2. Peak: 62 % IES), wobei der 1. Peak der von KARL (1974) auf dieselbe Weise isolierten IES-haltigen Proteinfraction mit einem MG = 36000 Daltons entsprechen muß, da diese gebundene IES (I) ebenfalls vom DEAE-Sephadexgel im Bereich einer Ionenstärke von 0,1-0,5 - allerdings auch nur unter großem IES-Verlust - eluiert wird. Die im 2. Peak vorliegende gebundene IES (II, Schema 6) konnte auch nicht näher untersucht werden, da sich nach Dialyse der mit 100 % Ammonsulfat ausgefällten IES-Verbindung II kaum mehr IES nachweisen ließ. Diese Aufteilung nach Anreicherung der löslichen gebundenen IES des NaCl-Extraktes mittels Gelfiltration auf 2 Peakfraktionen im Verhältnis 2:3 steht übrigens in Einklang mit den Ergebnissen von ZIMMERMANN (1971) und KARL (1974).

ZIMMERMANN (1971), der die gebundene IES des NaCl-Extraktes ebenfalls durch Ammonsulfatfällung isolierte, fand nach Elektrofocussierung 2 IES-enhaltende Proteinfractionen mit einem pH = 7,45 und 4,4. KARL (1974) beobachtete ebenfalls bei Chromatographie der mittels Ammonsulfat gefällten Proteine über Sephadex G 75 und G 100 immer 2 IES-haltige Proteinpeaks, wobei sich aber nicht bei jeder Auftrennung IES nachweisen ließ.

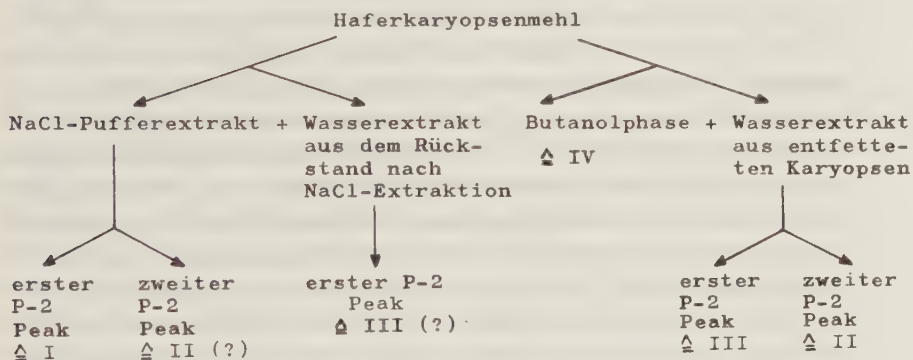
Da die beiden im NaCl-Extrakt vorliegenden IES-Verbindungen I und II zwar mittels Gelfiltration voneinander getrennt und bis dahin jeweils - im Gegensatz zu ZIMMERMANN (1971) und KARL (1974) - immer nachgewiesen werden konnten, aber eine Isolierung letztlich wegen ihrer hohen Instabilität nicht möglich schien, wurde die im Rückstand nach NaCl-Extraktion der Haferkaryopsen vorliegende gebundene IES näher untersucht, deren Charakterisierung und Isolierung bislang noch nicht versucht worden war. Dabei konnten die bereits gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Stabilisierung von IES-Esterverbindungen durchaus verwertet werden, da sich auch die mittels Wasserextraktion isolierte gebundene IES in Lösung als sehr instabil erwies. Dieser IES-Verbindung (III, Schema 6) aus der Albuminfraktion (= 35 % der im Rückstand nach NaCl-Extraktion vorliegenden geb. IES) konnte aber auch zugesetzte Ascorbinsäure über einen längeren Zeitraum hinweg keinen ausreichenden Schutz vor Zersetzung bieten. Erst mit 10^{-4} M Hydrochinon, das die Wirkung der Peroxidase unterbindet (AKAZAWA u. CONN, 1958), konnte diese gebundene IES in Lösung stabil gehalten werden (Tab. 18). Dieser zum ersten Mal beobachtete stabilisierende Einfluß des Hydrochinon (10^{-4} M) auf die wasserlösliche gebundene IES (Verbindung III) konnte später während der Auftrennung des Butanol-Wasserextraktes desöfteren noch bestätigt werden. So beträgt z.B. der IES-Wiederfund nach Entsalzen der 3. AcA-Fraktion über Biogel P-2 ohne Hydrochinonzusatz insgesamt nur 51 %, mit zugesetztem Hydrochinon aber 88 % der aufgetragenen Menge. Ebenso ließ sich der IES-Verlust während der Con A-Fällung ohne Hydrochinonzusatz in der salzfreien zweiten P-10 Fraktion in Abhängigkeit der Zeit bestimmen. So wurden bereits nach einer Stunde 60 %, nach 2 Stunden 82 % der eingesetzten gebundenen IES in Lösung ohne Hydrochinon zerstört.

Dennoch war aber - bedingt durch den NaCl-Gehalt - eine weitere Auftrennung und Anreicherung der aus dem Rückstand nach NaCl-

Extraktion gewonnenen IES-Fraktion ohne Abspaltung von IES aus der gebundenen Form und deren Zersetzung unmöglich. Deshalb wurde die Wasserextraktion auf mit n-Butanol entfettete Karyopsen übertragen, wobei im Wasserextrakt ca. 34 % der insgesamt vorhandenen Menge an gebundener IES isoliert werden konnten. Aus dem Rückstand des NaCl-Extraktes wurden mittels Wasserextraktion zwar 35 % der hier vorliegenden gebundenen IES extrahiert, bezogen auf die gesamte Menge der in Haferkaryopsen vorhandenen gebundenen IES entspricht diese isolierte IES-Menge aber nur mehr 14 %. Da im Wasserextrakt, der sich aus den entfetteten Karyopsen gewinnen ließ, 2 verschiedene durch DC voneinander trennbare IES-Verbindungen (III und II, Schema 6) im Verhältnis 1:1 vorliegen, wovon die höher molekulare (III, Schema 6) vermutlich identisch ist mit der IES-Verbindung (III, Schema 6) der Albuminfraktion, die sich aus dem Rückstand nach NaCl-Extraktion isolieren läßt, folgt daraus, daß im Wasserextrakt, der sowohl nach Entfetten der Karyopsen mit n-Butanol als auch nach NaCl-Extraktion erhalten werden kann, immer in etwa dieselbe Menge (ca. 15 % der gesamten gebundenen IES) dieser IES-Verbindung (III, Schema 6) vorliegt. Hingegen liegt die 2. IES-Verbindung (II, Schema 6) nur in dem Wasserextrakt vor, der aus entfetteten Karyopsen gewonnen wird. Deshalb muß diese gebundene IES während der NaCl-Pufferextraktion bereits in Lösung gehen und wahrscheinlich ist die 2. IES-haltige Verbindung (II, Schema 6) des Wasserextraktes identisch mit der im zweiten P-2 Peak vorliegenden gebundenen IES nach Gelfiltration der mit Ammonsulfat gefällten IES-Fraktion des NaCl-Extraktes. Bei der Auftrennung der beiden IES-Verbindungen (III und II, Schema 6) des Wasserextraktes, der aus entfetteten Karyopsen gewonnen wird, mittels Gelfiltration verteilen sich nämlich diese beiden IES-haltigen Verbindungen ebenfalls auf den ersten und zweiten P-2 Peak (II, Schema 6).

Eine weitere Indol-haltige Verbindung (IV, Schema 6) ließ sich zusätzlich noch in der Butanolphase nachweisen, womit dadurch in Haferkaryopsen zum ersten Mal insgesamt 4 verschiedene IES-Verbindungen aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit oder ihres Gelfiltrationsverhaltens gefunden waren (Schema 6).

Schema 6: Aufteilung der 4 verschiedenen IES-Verbindungen (I, II, III und IV) auf die aus Haferkaryopsen isolierten Extrakte



I : IES-Proteinfraktion mit $MG=36000$ Daltons (KARL, 1974)

II : niedermolekulare IES-Verbindung ($MG < 1000$), die über DC den gleichen R_f -Wert aufweist wie die von PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) isolierte IES-Esterfraktion

III: in dieser Arbeit charakterisierte niedermolekulare zuckerhaltige IES-Verbindung ($MG = 1200$)

IV : Indol-haltige Verbindung, bei der es sich sehr wahrscheinlich um einen IES-Zuckerester handelt

Die in der Butanolphase vorliegende Indol-Verbindung (IV, Schema 6) kann aufgrund vergleichender Untersuchungen mit den DC-Ergebnissen (Kieselgel, Fließmittel V, vgl. 6.4.) von UEDA u. BANDURSKI (1969), als auch EHMANN u. BANDURSKI (1974) mit großer Wahrscheinlichkeit als IES-Zuckerester angesehen werden. Bei DC-Chromatographie in Fließmittel V (vgl. 6.4.) wies diese Indol-Verbindung (IV, Schema 6), die sich während der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bei der Wassereextraktion der Haferkaryopsen in der Butanolphase finden ließ, einen R_f -Wert von 0,83 (Tab. 19) auf, was einem R_{IES} (bezogen auf den R_f -Wert der IES = 0,88) von 0,94 entspricht.

UEDA u. BANDURSKI (1969), die ihre Untersuchungen mit Maiskörnern durchführten, fanden ebenfalls in der von der extrahierten Wasserfraktion abgetrennten Butanolphase neben freier IES niedermole-

kulare IES-Verbindungen, die sich aufgetrennt über DC in Fließmittel V (vgl. 6.4.) auf 7 verschiedene zuckerhaltige Flecke verteilten. Die R_f -Werte dieser Flecke reichen aber nur von 0,22 bis 0,70, wobei es sich bei Verbindung B_1 und B_2 ($R_f = 0,52$ und $0,47$) um IES-Myoinositol-Isomere und bei B_3 und B_4 ($R_f = 0,32$ und $0,26$) um IES-Myoinositol-Arabinoside handelt. Aufgrund ihrer Untersuchungen konnten UEDA et al. (1970) die Verbindung B_5 , die in Fließmittel V (vgl. 6.4.) einen R_f -Wert von 0,22 aufweist, als IES-Myoinositol-Galaktosid identifizieren. EHMANN klärte 1974 mittels GC-MS die Strukturen der Verbindungen HRF_1 und HRF_2 , die in Fließmittel V (vgl. 6.4.) R_f -Werte von 0,6 bis 0,7 aufweisen, als IES-Glucose-Ester auf. Zusätzlich noch 2 weitere Myoinositol-Ester der IES fanden EHMANN u. BANDURSKI (1974) ebenfalls in der aus Maiskörnern extrahierten Butanolphase, deren Isomere in Fließmittel V (vgl. 6.4.) einen R_{IES} von 0,86-0,96 und 0,70-0,80 aufweisen. GC-MS Untersuchungen zeigten, daß hier Isomere der Verbindungen Tri(Indol-3-acetyl)myoinositol und Di-(Indol-3-acetyl)myoinositol vorlagen, deren Gehalt in Maiskörnern gleichzeitig mit nur ca. 0,1 % der gesamten vorhandenen IES-Estermenge bestimmt wurde. Da von allen in Maiskörnern identifizierten niedermolekularen IES-Estern der Butanolfraktion nur die Isomere des Tri-(Indol-3-acetyl)myoinositols ($R_{IES} = 0,86-0,96$) mit der in der Butanolphase aus Haferkaryopsen vorliegenden Indol-Verbindung (IV, Schema 6, $R_{IES} = 0,94$) einen übereinstimmenden R_f -Wert aufweisen, kann sowohl aus dem gemeinsamen Lösungs- als auch Chromatographieverhalten mit sehr großer Wahrscheinlichkeit gefolgert werden, daß auch in Haferkaryopsen diese IES-Verbindung vorliegt.

Im Wasserextrakt, der sowohl aus dem Rückstand nach NaCl-Extraktion als auch aus den entfetteten Karyopsen gewonnen wird, läßt sich gebundene IES nur gemeinsam mit der Albuminfraktion (ZIMMERMANN, 1978) isolieren, während mit 10 %iger gepufferter NaCl-Lösung nicht nur Globuline, sondern auch zum Teil Albumine in Lösung gehen. Deshalb kann es durchaus möglich sein, daß die gleiche IES-Verbindung (II, Schema 6) sowohl im Butanol-Wasserextrakt als auch im NaCl-Pufferextrakt vorliegt. Die zuckerhaltige IES-Verbindung (III, Schema 6) ließ sich aber eindeutig nur in den beiden Wasserextrakten

finden - anhand verschiedener Vergleiche konnte die Identität der jeweils gebundenen IES in dieser Arbeit mit großer Wahrscheinlichkeit dargelegt werden - zumal sich die ebenfalls nach Gelfiltration (Biogel P-2) im ersten P-2 Peak vorliegende IES-Verbindung (I, Schema 6) des NaCl-Pufferextraktes durch ihr Verhalten bei Ionenaustauscherchromatographie (Bindung bei pH = 7,0) ganz entschieden von der zuckerhaltigen IES-Verbindung (III, Schema 6) unterscheidet.

Die sowohl mittels DC als auch Gelfiltration (Biogel P-2: zweiter P-2 Peak) aus dem Butanol-Wasserextrakt abgetrennte IES-Verbindung II (Schema 6) läßt sich zwar nicht mittels Wasserextraktion aus dem Rückstand nach NaCl-Extraktion isolieren, dafür liegt aber in der NaCl-Pufferlösung (= Überstand) gebundene IES vor, die sich ebenfalls nach Gelfiltration (Biogel P-2) im zweiten P-2 Peak finden läßt (vgl. Schema 6). Die Tatsache, daß diese gebundene IES bei einer Ammonsulfatsättigung von 20-100 % ausfällt, was durchaus auch dem Verhalten von Albuminen entspricht, bestärkt die Vermutung, daß diese gebundene IES mit der niedermolekularen IES-Verbindung II (Schema 6) des Butanol-Wasserextraktes identisch sein könnte.

Die niedermolekulare IES-Verbindung (II, Schema 6), die gemeinsam mit der zuckerhaltigen gebundenen IES (III, Schema 6) im Verhältnis 1:1 im Wasserextrakt vorliegt, der aus entfetteten Karyopsen gewonnen wurde, läßt sich sowohl mittels DC und Gelfiltration (Biogel P-2) als auch aufgrund ihres Lösungsverhaltens bereits aus dem Rohextrakt abtrennen. Mittels Gelfiltration (zweiter P-2 Peak) konnte gezeigt werden, daß diese gebundene IES (II, Schema 6) ein MG < 1000 aufweist. Als Bindungspartner der IES muß aufgrund der DC-Trennungen sowohl ein Peptid, als auch Zucker diskutiert werden, da nach der Auftrennung des Rohextraktes als auch des zweiten P-2 Peaks (II, Schema 6) in Fließmittel VII (vgl. 6.4.) und IX (Abb. 14) der IES-positive Fleck (R_f VII = 0,76; R_f IX = 0,71) jedesmal Zucker- und auch AS-Anfärbung zeigte. Wahrscheinlich ist aber die IES in dieser Verbindung (II, Schema 6) eher mit einem Peptid als mit Zuckern verestert, da bei DC (Fließmittel IX) des Rohextraktes (Abb. 14) bei einem R_f -Wert von 0,74 sowohl im Fließmittel gelösten als auch im nur wasserlöslichen Anteil der Probe eine positive Zuckerreaktion stattfindet, während die abgetrennte IES-Verbin-

dung II ($R_f = 0,71$) und auch die Ninhydrin-positive Substanz ($R_f = 0,70$) nur im Fließmittel löslichen Anteil zu finden sind. Erhärtet wird diese Vermutung zusätzlich durch die DC-Ergebnisse (Fließmittel IX; 6.4.) der beiden mittels Gelfiltration (Biogel P-2) voneinander getrennten IES-haltigen Fraktionen (III und II, Schema 6) des Rohextraktes, wobei sich in der zweiten P-2 Fraktion, aber wiederum nur im Fließmittel gelösten Anteil, bei einem $R_f = 0,71$ die gebundene IES und zugleich eine Ninhydrin-positive Substanz finden ließen, während sich die zuckerhaltigen Substanzen bei diesem R_f -Wert gleichmäßig sowohl auf den im Fließmittel als auch nur im Wasser löslichen Anteil der zweiten P-2 Fraktion verteilten. In Übereinstimmung damit wurde bei der DC-Chromatographie der ersten P-2 Fraktion außer bei einem $R_f = 0,4$ keine Ninhydrin-positive Substanz mehr gefunden (Abb. 15). Hingegen konnten im Bereich des $R_f = 0,56$ - $0,78$, wo sich keine positive IES-Reaktion finden ließ, noch mehrere zuckerhaltige Verbindungen nachgewiesen werden. Aus diesen immer mit derselben Probe parallel durchgeführten DC-Chromatographien geht deshalb hervor, daß nur die Peptidfraktion, die denselben R_f -Wert wie die abgetrennte gebundene IES aufweist, sowohl vor als auch nach Auftrennung des Rohextraktes mittels Gelfiltration ein mit der IES-Verbindung (II, Schema 6) immer übereinstimmendes Lösungsverhalten zeigt. Die entsprechende Zuckerfraktion unterscheidet sich dagegen aufgrund ihrer ständigen Anwesenheit in allen chromatographierten Proben von dieser IES-Verbindung II.

Im Gegensatz dazu glauben PERCIVAL u. BANDURSKI (1976), die ebenfalls aus Hafermehl eine wasserlösliche IES-Esterfraktion isolierten und diese auch über DC in Fließmittel VII (vgl. 6.4.) auftrennten, IES-Glykoproteine vorliegen zu haben, da die gebundene IES gemeinsam mit Ninhydrin- und Anthron-positivem Material in einer Fluoreszenz-Zone ($R_f = 0,75$ - $0,90$) cochromatographierte. Aufgrund der Instabilität ihrer IES-Ester war es ihnen aber nicht möglich, diese Zone weiter aufzureinigen und zu isolieren. Deshalb konnten sie nur Rückschlüsse aus ihren gesammelten Daten ziehen, die aber die gesamte IES-haltige Fraktion betreffen. Obwohl diese IES-haltigen Polymere von PERCIVAL u. BANDURSKI (1976), die mittels Bindung an Kationen-

austauscher ($\text{pH} = 3,0$) aus einem 50 %igen Acetonextrakt isoliert wurden, einen ähnlichen R_f -Wert ($0,75-0,90$) wie die IES-Verbindung II (Schema 6, $R_f = 0,76$) der vorliegenden Arbeit aufweisen, haben sie doch erstaunlicherweise ein stark unterschiedliches MG ($5000-20000$ Daltons) im Vergleich zur IES-Verbindung II ($\text{MG} < 1000$ Daltons). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte im unterschiedlichen Grad der Aufreinigung der beiden IES-haltigen Fraktionen liegen. Die in dieser Arbeit bereits im Rohextrakt sicher nachgewiesene IES-Verbindung II (Schema 6) wird nämlich überraschenderweise bei Gelfiltration des Rohextraktes über Ultrogel AcA 54 gemeinsam mit der zuckerhaltigen IES-Verbindung (III, Schema 6) im MG-Bereich von $7000-13500$ Daltons (Abb. 12) eluiert. Bei Verwendung des Sephadex G 50 Gels verteilte sich die gebundene IES des Rohextraktes auf ein noch größeres Elutionsvolumen ebenfalls im selben MG-Bereich, entsprechend den Daten von PERCIVAL u. BANDURSKI (1976). Erst bei der Entsalzung der IES-haltigen AcA-Fraktion oder aber bei Gelfiltration des Rohextraktes über ein Gel mit sehr niedriger Ausschußgrenze (Biogel P-2) konnten die beiden IES-Verbindungen des Rohextraktes (III und II, Schema 6) voneinander getrennt werden. Deshalb kann es durchaus möglich sein, daß die IES-Verbindung II der vorliegenden Arbeit der IES-Verbindung von PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) entspricht, da beide neben einem gemeinsamen R_f -Wert in Fließmittel VII auch dieselben Lösungseigenschaften aufweisen. Obwohl die IES-Verbindung II vorliegender Arbeit nicht an Ionenaustauschergele (Tab. 19) gebunden werden konnte, so stimmt dieser Befund dennoch auch mit den Angaben von PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) überein, da ihre IES-haltigen Polymere bei $\text{pH} = 3$ zwar gebunden, aber bei $\text{pH} = 4$ bereits wieder eluiert wurden. In Übereinstimmung damit fand auch an Bio-Rex bei $\text{pH} = 4$ in der vorliegenden Arbeit keine Bindung der IES-Fraktion statt (Tab. 19). Da aber bei diesem pH -Wert und dem verwendeten Gel bereits eine Zersetzung der IES festgestellt werden mußte, wurden deshalb keine weiteren Versuche mit tieferen pH -Werten durchgeführt.

Die mittels Wasserextraktion sowohl aus entfetteten Haferkaryopsen als auch aus dem Rückstand nach NaCl-Extraktion isolierte zuckerhaltige IES-Verbindung (III, Schema 6) ist bislang weder isoliert noch beschrieben oder charakterisiert worden. Obwohl

PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) zwar mittels 50 %igem Aceton die gesamte in Hafermehl vorliegende gebundene IES (BANDURSKI u. SCHULZE, 1977) extrahieren konnten, enthielt ihre über Ionenaustauscherchromatographie gewonnene IES-Esterfraktion diese zuckerhaltige IES-Verbindung (III, Schema 6) nicht. Bei DC-Chromatographie in Fließmittel VII (vgl. 6.4.) lief nämlich die in vorliegender Arbeit näher untersuchte IES-Verbindung III nicht, während aber PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) nach entsprechender DC-Auftrennung ihrer IES-Esterfraktion am Start keine IES finden konnten. Deshalb muß diese gebundene IES (III, Schema 6) wohl in der bei pH = 3 nicht an SP-Sephadex bindenden Fraktion zu suchen sein, die ca. 1/3 der gesamten mit Ammonsulfat, Aceton oder Äthanol fällbaren IES-Ester (PERCIVAL u. BANDURSKI, 1976) umfaßt. Diese Fraktion wurde aber von den Autoren nicht weiter aufgearbeitet.

Die insgesamt in Haferkaryopsen vorhandene gebundene IES befindet sich zur einen Hälfte im Wasserextrakt, zur anderen Hälfte im wasserunlöslichen Rückstand (ZIMMERMANN, 1978). Die nun hier erstmals nachgewiesene IES-Verbindung III (Schema 6) liegt zusammen mit der IES-Verbindung II (Schema 6) im Verhältnis 1:1 ausschließlich im Wasserextrakt vor. Die zuckerhaltige IES-Verbindung III stellt somit maximal 25 % der Gesamtmenge an gebundener IES dar.

Das MG dieser zuckerhaltigen IES-Verbindung III ließ sich in der am besten aufgereinigten Fraktion mittels Gelfiltration mit 1100-1400 Daltons (Abb. 22) bestimmen. Da sich nun einerseits die IES-Verteilung und die der Zucker nach Gelfiltration über Biogel P-4 (Abb. 22) in ausgezeichneter Weise korrelieren lassen und andererseits sich die gebundene IES von einer Kohle-Celite-Säule (3.2.6.) mittels 50 %igem Äthanol eluieren läßt, kann nun geschlossen werden, daß die IES-Verbindung einen Zuckeranteil aufweisen muß. Deshalb ist auch erklärbar, weshalb diese IES-Verbindung III von allen Säulen immer in einem breitgezogenen Peak eluiert wird, was dem chromatographischen Verhalten von Zuckern entspricht. Andererseits folgt daraus, da alle Säulen nur zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen und Peptiden bestimmt sind und mit Dextranen dabei abweichende Ergebnisse erhalten werden, daß das MG der zuckerhaltigen IES-Verbindung III mittels Gelfiltration nicht sehr genau bestimmt worden ist. Größere Abweichungen sind daher durchaus denkbar.

Mittels DC war eine Auftrennung der gebundenen IES (III, Schema 6) nie möglich, da diese in allen getesteten Fließmitteln nicht zum Laufen gebracht werden konnte. Selbst in Fließmittel IX (vgl. 6.4.), in dem freie IES und auch der IES-Serylester relativ hohe R_f -Werte aufweisen (R_f IES = 0,90; R_f Ester = 0,85), ebenso wie Oligosaccharide bis zu 4 Einheiten (R_f = 0,54) sehr gut auftrennen (Tab. 24), wurde die gebundene IES (III, Schema 6) am Start gefunden. Nimmt man das MG dieser gebundenen IES mit 1200 Daltons an, so entspräche das einem reinen Zuckeranteil von ca. 5 Monosaccharid-Einheiten. Da aber vermutlich eine solche Verbindung in diesem Fließmittel laufen sollte (vgl. Tab. 24), kann daher angenommen werden, daß entweder das MG sehr wahrscheinlich höher liegen muß, oder aber in dieser Verbindung III liegen nicht nur Zuckerkomponenten als Bindungspartner der IES vor.

Obwohl nun die gebundene IES (III, Schema 6) nachweislich einen Zuckeranteil aufweist, konnte sie weder an Con A-Sephrose gebunden noch mit dem Lectin ausgefällt werden. Deshalb können in dieser Verbindung keine Glucosyl- oder sterisch verwandte Reste mit freien Hydroxylgruppen an C_3 , C_4 und C_6 des Zuckerringes vorliegen (OGATA et al., 1975).

Die von PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) beschriebene ständige Co-chromatographie ihrer IES-Esterfraktion mit UV-absorbierenden Substanzen, die sie als Phenole identifizierten, konnte während der Aufreinigung der gebundenen IES (III, Schema 6) mittels Gelfiltration aufgrund der dadurch bedingten gelben Färbung ebenfalls immer beobachtet werden. Es ist bereits bekannt, daß Substanzen während der Extraktion von Pflanzenmaterial mit Phenolen reagieren können (LOOMIS u. BATTOILE, 1966). Da aber immer nur die IES-haltigen Fraktionen (z.B. zweiter P-10 Peak) im Gegensatz zu zuckerhaltigen Proteinpeaks (z.B. erster P-10 Peak) damit assoziiert sind, müssen die Phenole entweder kovalent an die IES-Ester gebunden vorliegen oder die IES-Ester reagieren bevorzugt mit diesen phenolischen Verbindungen während der Extraktion. Aus Weizenendosperm ist z.B. ein Glykoprotein bekannt, das mit Phenolen verknüpft vorliegt (FAUSCH et al., 1963), wobei das Absorptionsspektrum dieser Verbindung (KÜNDIG et al., 1961; PATIL et al., 1975), ebenso wie das der IES-Ester

von PERCIVAL u. BANDURSKI (1976) dem der zuckerhaltigen IES-Verbindung III (Abb. 23) dieser Arbeit sehr ähnelt. Die hochmolekularen zuckerhaltigen IES-Ester aus Mais enthalten ebenfalls phenolische Verbindungen (PISKORNIK u. BANDURSKI, 1972). Für eine kovalente Bindung der zuckerhaltigen IES-Verbindung III mit Phenolen spricht zudem auch der Befund, daß bei Adsorptionschromatographie an einer Kohle-Celite-Säule die IES-Verbindung III mittels Äthanol gemeinsam mit der gelbgefärbten Substanz von der Säule eluiert wurde. Wäre die phenolische Substanz in freier Form in der IES-Fraktion enthalten, so hätte sie irreversibel an die Aktivkohle gebunden.

Im UV-Spektrum der salzfreien zweiten P-10 Fraktion nach Con A-Fällung (Abb. 23) wird bei $E = 280 \text{ nm}$ ein Maximum aufgezeichnet, dessen Höhe nicht allein von der IES-Konzentration bedingt sein kann (vgl. 3.2.7.). Da diese Fraktion einen nur sehr geringen Proteinanteil aufweist (vgl. Tab. 32), kann die Extinktion bei 280 nm auch nicht nur auf Absorption von Proteinen oder Peptiden zurückgeführt werden. Deshalb muß dieses Absorptionsmaximum auf einer anderen Komponente beruhen, wobei die Vermutung sehr nahe liegt, daß es sich hierbei um die phenolische Substanz handelt, die mit der IES-Verbindung III verknüpft vorliegt, da sich Phenole durch eine starke UV-Absorption in diesem Wellenlängenbereich ($270\text{--}320 \text{ nm}$) auszeichnen.

Nach Gelfiltration (Abb. 21) konnten IES-Verbindung III und ein bei $E = 280 \text{ nm}$ aufgezeichneter Peak ($MG = 1200$) gut in Korrelation zueinander gebracht werden. Aufgrund der vorhergehenden Darlegungen kann nun gefolgert werden, daß dieser Peak eventuell auf die phenolische, gelbgefärbte Substanz zurückzuführen ist. Da bei $MG = 1200$ Daltons die Elutionsprofile von IES, Zucker und der $E = 280 \text{ nm}$ (Abb. 21, 22) sehr gut übereinstimmen, kann nach den hier vorliegenden Ergebnissen die Existenz eines niedermolekularen zuckerhaltigen IES-Esters, der mit einer phenolischen Substanz verknüpft vorliegt, in Haferkörnern vermutet werden.

Die am besten untersuchten natürlich vorkommenden IES-Ester sind bis heute aus Maiskörnern isoliert worden. Am gründlichsten ist dabei die wasserlösliche Fraktion identifiziert, die Ester der IES mit Glucose, Inositol und Inositol-Glykosiden enthält. Die wasserunlösliche Fraktion besteht aber ebenfalls - nur aus hochmolekularen - IES-Zuckerestern. *Avena sativa* und *Zea mays*

gehören zwar verschiedenen Unterfamilien der Gramineae an, dennoch scheint die wasserlösliche gebundene IES bei beiden Arten in relativ niedermolekularen Verbindungen vorzuliegen. Da bei Mais die wasserunlösliche IES-Verbindung aus einem hochmolekularen Zuckerester besteht, kann vermutet werden, daß es sich bei der in der Glutelinfraktion (ZIMMERMANN, 1978) des Hafers vorliegenden wasserunlöslichen gebundenen IES ebenfalls um eine hochmolekulare IES-Verbindung handelt.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Der IES-Gehalt von Haferkaryopsen (Sorte Husar, Ernte 1974) wurde mit verschiedenen Methoden (DC, GC, Biotest) quantitativ ermittelt, wobei immer übereinstimmende Ergebnisse erhalten werden konnten. Der Gesamtgehalt an IES beträgt in 100 g Körnern 1,526 mg, wovon 0,057 mg/100 g Körner (= 3,7 %) als freie IES vorliegen und 1,463 mg/100 g Körner (= 96,3 %) als gebundene IES nachweisbar sind.
2. Der IES-Gehalt, der sowohl vom Erntejahr als auch von der Hafersorte abhängig ist, verringert sich mit der Dauer der Lagerung der Haferkörner, wobei aber nur die gebundene Form der IES abgebaut wird (ca. 40 % innerhalb von 2 Jahren. In Haferkaryopsen (= entspelzte Körner) vollzieht sich diese Abnahme der gebundenen IES noch wesentlich schneller als in Körnern. Der Gehalt an freier IES verändert sich nicht mit zunehmendem Alter der Körner.
3. Die gebundene IES der Haferkaryopsen läßt sich mittels 10 %iger NaCl-Extraktion auf 2 Fraktionen aufteilen, wobei im Überstand (= löslich gebundene IES) 46 % und im Rückstand (= unlöslich gebundene IES) 54 % zu finden sind. Die löslichen IES-Proteine im NaCl-Extrakt ließen sich aufgrund ihrer hohen Instabilität nicht aufreinigen bzw. isolieren. Die im Rückstand vorliegende gebundene IES konnte mittels Wasserextraktion zu 35 % in Lösung gebracht und untersucht werden.
4. Eine reine Wasserextraktion (ohne vorhergehende NaCl-Behandlung) nach Entfetten der Karyopsen mit n-Butanol liefert hingegen deutlich höhere Ausbeuten an gebundener IES. Wegen der größeren Stabilität der gebundenen IES und aufgrund des von Anfang an geringeren Anteils an Fremdstoffen ist diese Extraktion der Extraktion nach NaCl-Behandlung vorzuziehen.

5. Im Wasserextrakt des mit n-Butanol entfetteten Karyopsenmehls liegen 2 IES-Verbindungen (III und II) im Verhältnis 1:1 vor, die sich aufgrund unterschiedlicher DC- und gel-chromatographischer- sowie Lösungseigenschaften trennen lassen.
6. Durch Zugabe von Hydrochinon ($10^{-4}M$) lassen sich die beiden IES-Ester-Verbindungen III und II in Lösung stabilisieren.
7. IES-Verbindung III, die sich mittels Gelfiltration hinreichend gut aufreinigen läßt, wurde charakterisiert. Ihre Auftrennung gelingt aber nur dann, wenn von Gelen mit einer größeren Ausschlußgrenze zu Gelen mit einer niederen Grenze successive übergegangen wird. Das mit dieser Methode ermittelte MG der IES-Verbindung III beträgt 1200 Daltons.
8. Als Bindungspartner der IES in Verbindung III konnten aufgrund von Co-Chromatographie (Biogel P-4, DC) sowie ihres Desorptionsverhaltens an einer Kohle-Celite-Säule Zucker nachgewiesen werden. Dabei sind maximal 3 verschiedene Zuckerkomponenten (= Glucose, Galaktose, Inosit) beteiligt. Aufgrund ihrer Unfähigkeit, mit dem Lectin Con A eine Komplexbildung einzugehen, muß gefolgert werden, daß die IES-Verbindung III keine D-Glucosyl- oder sterisch verwandte Reste mit freien OH-Gruppen an C₃, C₄ und C₆ des Zucker-ringes aufweist.
9. Die zuckerhaltige IES-Verbindung III ist wahrscheinlich mit Phenolen korreliert. Dies geht aus der ständigen Co-Chromatographie (Säulenchromatographie) der Verbindung mit UV-absorbierendem Material selbst nach Kohle-Celite-Säulenchromatographie (bei der freie Phenole irreversibel gebunden werden) hervor.
10. Insgesamt konnten in Haferkaryopsen aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit oder ihres Gelfiltrationsverhaltens 4 verschiedene IES-Verbindungen gefunden werden (Schema 6), wobei es sich bei Verbindung I um ein IES-Protein handelt. IES-Verbindung II (MG < 1000 Daltons) weist mit großer Wahrscheinlichkeit einen Peptidanteil auf, während IES-Verbindung III (MG = 1200) nachweislich einen IES-Zuckerester (vermutlich mit Phenolanteil) darstellt. Bei der Butanol-löslichen, Indol-haltigen Verbindung IV scheint es sich ebenfalls um einen IES-Zuckerester zu handeln.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- AKAZAWA, T. a. E.E. CONN: The oxidation of reduced pyridine nucleotides by peroxidase - Jour.Biol.Chem. 232, 403 (1958)
- ANDREAE, W.A. a. N.E. GOOD: The formation of indoleacetyl-aspartic acid in pea seedlings - Plant Physiol. 30, 280 (1955)
- ANDREAE, W.A. a. M.W. van YSSELSTEIN: Studies on 3-indole-acetic acid metabolism. VI 3-indole-acetic acid uptake and metabolism by pea roots and epicotyls - Plant Physiol. 35, 225 (1960)
- ANDREWS, P.: The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range - Biochem.J. 96, 595 (1965)
- ASPBERG, K. a. J. PORATH: Group-specific adsorption of glycoproteins - Acta Chem.Scand. 24, 1839 (1970)
- ATSUMI, S., S. KURAISHI a. T. HAYASHI: An improvement of auxin extraction procedure and its application to cultured plant cells - Planta 129, 245 (1976)
- AVERY, G.S., J. BERGER a. B. SHALUCHA: The total extraction of free auxin and auxin precursor from plant tissue - Am.J.Bot. 28, 596 (1941)
- BANDURSKI, R.S. a. A. SCHULZE: Concentrations of indole-3-acetic acid and its esters in Avena and Zea - Plant Physiol. 54, 257 (1974)
- BANDURSKI, R.S. a. A. SCHULZE: Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants - Plant Physiol. 60, 211 (1977)
- BASLER, H.: Grundbegriffe der Wahrscheinlichkeitsrechnung und statistische Methodenlehre - Physica-Verlag, Würzburg, Wien, 142 (1973), 4. Auflage
- BENTLEY, J., K.R. FARRAR, S. HOUSLEY, G.F. SMITH a. W.C. TAYLER: Some chemical and physiological properties of 3-indolyl-pyruvic acid - Biochem.J. 64, 44 (1956)

- BERGER, J. a. G.S. AVERY: Isolation of an auxin precursor and an auxin (indoleacetic acid) from maize - Am.J.Bot. 31, 199 (1944)
- BETZ, A.: Ascorbinsäure, NADH, Cystein und Glutathion hemmen den durch Peroxidase katalysierten oxidativen Abbau von β -Indolyl-essigsäure - Zeitschrift für Botanik 51, 424 (1964)
- BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding - Anal.Biochem. 72, 248 (1976)
- CHATTERJEE, A.K. a. R. MONTGOMERY: The carbohydrate of ovomucoid - Arch.Biochem.Biophys. 99, 426 (1962)
- CHRAMBACH, A., R.A. REISFELD, M. WYCKOFF a. J. ZACCARI: A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis - Anal. Biochem. 20, 150 (1967)
- CLARKE, A.E. a. M.A. DENBOROUGH: The interaction of concanavalin A with blood-group-substance glycoproteins from human secretions - Biochem.J. 121, 811 (1971)
- DAVIS, B.J.: Disc electrophoresis - II Method and application to human serum proteins - Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 404 (1964)
- DAVIS, P.J.: The fate of exogenously applied indoleacetic acid in light grown stems - Physiol.Plant. 27, 262 (1972)
- DOYLE, R.J. a. L. CRONHOLM: A model antigen-antibody system for classroom use - J.Chem.Ed. 46, 868 (1969)
- EASELEY, C.W.: Combination of specific color reactions useful in the peptide mapping technique - Biochim.Biophys.Acta 107, 386 (1965)
- EHMANN, A.: Identification of 2-O-(indole-3-acetyl)-D-glucopyranose, 4-O-(indole-3-acetyl)-D-glucopyranose and 6-O-(indole-3-acetyl)-D-glucopyranose from kernels of Zea mays by gas-liquid chromatography-mass spectrometry - Carbohydr. Res. 34, 99 (1974)
- EHMANN, A. a. R.S. BANDURSKI: The isolation of di-O-(indole-3-acetyl)-myo-inositol and tri-O-(indole-3-acetyl)-myo-inositol from mature kernels of Zea mays - Carbohydr.Res. 36, 1 (1974)
- ELLIOT, B.B. a. A.C. LEOPOLD: An inhibitor of germination and of amylase activity in oat seeds - Physiol.Plant. 6, 65 (1953)

- FAHRNEY, D.E. a. A.M. GOLD: Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I Rates of reaction with acetylcholinesterase, α -chymotrypsin and trypsin - J.Am.Chem.Soc. 85, 997 (1963)
- FAUSCH, H., W. KÜNDIG a. H. NEUKOM: Ferulic acid as a component of a glycoprotein from wheat flour - Nature 199, 287 (1963)
- FEUNG, Ch., R.H. HAMILTON a. R.O. MUMMA: Metabolism of indole-3-acetic acid. IV Biological properties of amino acid conjugates - Plant Physiol. 59, 91 (1977)
- FINCHER, G.B., W.H. SAYER a. B.A. STONE: Chemical and physical properties of an arabino galactan-peptide from wheat endosperm - Biochem.J. 139, 535 (1974)
- FISKE, L.H. a. Y. SUBBAROW: The colorimetric determination of phosphorus - J.Biol.Chem. 66, 375 (1925)
- FLYNN, R.M., M.E. JONES a. F. LIPMAN: A colorimetric determination of inorganic phosphate - J.Biol.Chem. 211, 791 (1954)
- GOLDBACH, H. a. G. MICHAEL: Abscissic acid content of barley grains during ripening as affected by temperature and variety - Crop.Science 16, 797 (1976)
- GOLDSTEIN, I.J., C.E. HOLLERMAN a. E.E. SMITH: Protein-carbohydrate interaction. II Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides - Biochem. 4, 876 (1965)
- GORDON, S.A.: Auxin-protein complexes of the wheat grain - Am.J.Bot. 33, 160 (1946)
- GORTNER, W.A. a. M.J. KENT: The coenzyme requirement and enzyme inhibitors of pineapple IAA-oxidase - J.Biol.Chem. 233, 731 (1958)
- GRAHAM, J.S.D.: Starch-gel electrophoresis of wheat flour proteins - Aust.J.Biol.Sci. 16, 342 (1963)
- GUTTENBERG, v.H. u. E. LEHLE-JOERGES: Über das Vorkommen von Auxin und Heteroauxin in ruhendem und keimendem Samen - Planta 35, 281 (1947)
- HALL, P.J. a. R.S. BANDURSKI: Isolation and characterization of indole-3-acetyl-myo-inositol from *Oryza sativa* - Plant Physiol.Suppl. 63, 50 (1979)

- HAMILTON, R.H., R.S. BANDURSKI a. B.H. GRIGSBY: Isolation of indole-3-acetic acid from corn kernels and etiolated corn seedlings - Plant Physiol. 36, 354 (1961)
- HEMBERG, T.: Studies on the balance between free and bound auxin in germinating maize - Physiol.Plant. 8, 418 (1955)
- HEMBERG, T.: Auxins and growth-inhibiting substances in maize kernels - Physiol.Plant. 11, 284 (1958)
- HOCHSTRASSER, K.: Über die Bindungsart von Kohlenhydrat an Protein in Gerstenalbumin. II Nachweis von O-Glucosidpeptidbindungen (IX. Mitteilung über Samenproteine) - Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 328, 61 (1962)
- IHL, M.: Indole-acetic-acid binding proteins in soybean cotyledon - Planta 131, 223 (1976)
- JUEL, J.: Der Auxingehalt in Samen verschiedenen Alters sowie einige Untersuchungen betreffend der Haltbarkeit der Auxine - Planta 32, 227 (1941)
- KALDEWEY, H.: Einfache Indolderivate und pflanzliche Wachstumsregulatoren. In: Stahl E., Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag, B.H.N.Y., 449 (1967), 2. Auflage
- KALDEWEY, H. u. E. STAHL: Die quantitative Auswertung dünn-schichtchromatographisch getrennter Auxine in Avena Tageslichttest nach Söding - Planta 62, 22 (1964)
- KARL, R.: Untersuchungen zur Auftrennung von Haferkörnerproteinen, die kovalent gebundene Indolyl-3-essigsäure enthalten - Diplomarbeit an der Biologischen Fakultät der Universität München (1974)
- KARL, R.: Untersuchungen an keimungshemmenden Extrakten aus Spelzen von Avena sativa L. - Dissertation des Fachbereichs Biologie der Universität München (1978)
- KENNEDY, J.F. a. A. ROSEVEAR: An assessment of the fractionation of carbohydrates on concanavalin A-sepharose 4 B by affinity chromatography - J.Chem.Soc.Perkin.Trans. (I) 19, 2041 (1973)
- KNEGT, E. a. J. BRUINSMA: A rapid, sensitive and accurate determination of indolyl-3-acetic acid - Phytochem. 12, 753 (1973)

- KOCOUREK, J., M. TICHA a. J. KOSTIR: The use of diphenylamine aniline-phosphoric acid reagent in the detection and differentiation of monosaccharides and their derivatives on paper chromatograms - J.Chromat. 24, 117 (1966)
- KOTAKA, S., A.P. KRUEGER a. P.C. ANDRIESE: Effect of air ions on IAA content of barley seedlings - Plant a. Cell Physiol. 6, 711 (1965)
- KRUSIUS, T.: A simple method for the isolation of neutral glycopeptides by affinity chromatography - FEBS Letters 66, 86 (1976)
- KÜHNAU, G. u. W. GANSSMANN: Hafer, ein Element der modernen Ernährung - Umschau, Verlag Breidenstein KG, Frankfurt/M., 27 (1976)
- KÜNDIG, W., H. NEUKOM u. H. DEUEL: Untersuchungen über Getreideschleimstoffe. II Über die Gelierung wäßriger Lösungen von Weizenmehlpentosanen durch Oxidation - Helv.Chim. Acta 44, 969 (1961)
- LÄRSEN, P.: Biological determination of natural auxins. In: Ruhland W. (Ed.) Encyclopedia of plant physiology, Vol. 14, 521, Springer Verlag, Berlin (1961)
- LARSEN, P., K. PEACH a. M.V. TRASEY: Growth substances in higher plants. In: Modern methods of plant analysis, Springer Verlag, B.G.H., Vol. III, 565 (1955)
- LEBEDEV, A.V., V.P. NEUDACHIN, V.G. ZIMA a. V.G. RYADCIKOV: Isoelectric focusing of normal corn proteins in a density gradient. 1. Isoelectric focusing of alcohol-soluble proteins - Science Tools 23, 22 (1976)
- LI, Y.-T.: Studies on the glycosidases in Jack bean meal. I Isolation and properties of α -mannosidase - J.Biol. Chem. 242, 5474 (1967)
- LLOYD, K.O.: The preparation of two insoluble forms of the phytohemagglutinin, concanavalin A, and their interactions with polysaccharides and glycoproteins - Arch.Biochem. Biophys. 137, 460 (1970)
- LOOMIS, W.D. a. J. BATTOILE: Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes - Phytochem. 5, 423 (1966)

- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR a. R.J. RANDALL:
Protein measurement with the folin phenol reagent -
J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)
- Mc CUBBIN, W.D. a. C.M. KAY: Molecular weight studies on
concanavalin A - Biochem.Biophys.Res.Comm. 44, 101
(1971)
- Mc GUCKIN, W.F. a. B.F. Mc KENZIE: An improved periodic acid
fuchsin sulfite staining method for evaluation of glyco-
proteins - Clin.Chem. 4, 476 (1958)
- MAILLARD, L.C.: Action des acides aminés sur les sources
formation des mélanoidines par voie méthodique - Compt.
Rend. 154, 66 (1912)
- MAURER, H.R.: Disc-polyacrylamide-gel electrophoresis. In:
Disc-electrophoresis and related techniques of poly-
acrylamide-gelectrophoresis, Verlag Walter de Gruyter,
Berlin, N.Y. (1971)
- MONTREUIL, J., B. CASTIGLIONI, A. ADAM-CHOSSE, F. CANER a.
J. QUEVAL: Etudes sur les glycoprotéides. VIII L'hétéro-
généité de l'ovomucoïde - J.Biochem. (Tokyo) 57, 514
(1965)
- NICHOLLS, P.B.: The isolation of indole-3-acetyl-2-O-myo-
inositol from zea mays - Planta 72, 258 (1967)
- OGATA, S., T. MURAMATSU a. A. KOBATA: Fractionation of glyco-
peptides by affinity column chromatography on concanavalin
A-sepharose - J.Biochem. 78, 687 (1975)
- ORNSTEIN, L.: Disc electrophoresis. I Background and theory -
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 321 (1964)
- PATIL, S.K., C.C. TSEN a. D.R. LINEBOCK: Water-soluble
pentosans of wheat flour. II Characterization of pentosans
and glycoproteins from wheat flour and dough mixed under
various conditions - Cereal Chem. 52, 57 (1975)
- PERCIVAL, F.W. a. R.S. BANDURSKI: Esters of indole-3-acetic
acid from Avena seeds - Plant Physiol. 58, 60 (1976)
- PIGMAN, V. and D. HORTON: The carbohydrates. Chemistry and
biochemistry: IV Composition of glycoproteins, 634; Cereal
glycoproteins, 667, Academic Press, N.Y. a. London, Vol. II
B (1970) sec. edition

- PISKORNIK, Z. a. R.S. BANDURSKI: Purification and partial characterization of a glucan containing indole-3-acetic acid - Plant Physiol. 50, 176 (1972)
- PRZYBYLLOK, T. a. W. NAGL: Auxin concentration in the embryo and suspensors of *Tropaeolum majus*, as determined by mass fragmentation (single ion detection) - Z.Pflanzenphysiol. 84, 463 (1977)
- ROSWELL, E.: Transaminases in animal tissue homogenates. In: S.P. Colowick a. N.O. Kaplan, Methods in Enzymology, Bd. 5, 685, Academic Press N.Y. (1962)
- SAGI, F.: Silicalgel or cellulose for thin-layer chromatography of indole-3-acetic acid - J.Chromat. 39, 334 (1969)
- SCHMALTZ, A.: Analytische Untersuchungen zur Bestimmung von freier und an Makromoleküle gebundener Indolyl-3-Essigsäure in Haferkeimlingen - Diplomarbeit an der Biologischen Fakultät der Universität München (1973)
- SHAPIRO, A.L., E. VINUELA a. J.V. MAIZEL: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels - Biochem.Biophys.Res.Comm. 28, 815 (1967)
- SIEGERT, C.: Bestimmung der freien und gebundenen Indolyl-3-essigsäure während der Keimung von Haferkörnern - Diplomarbeit an der Biologischen Fakultät der Universität München (1974)
- SNELL, F.D. a. C.T. SNELL: Colorimetric methods of analysis, Bd. 3, Toronto, N.Y., London (1955)
- SONDHEIMER, E.: Chlorogenic acids and related depsides - Bot.Rev. 30, 667 (1964)
- SONDHEIMER, E. a. D.H. GRIFFIN: Activation and inhibition of indoleacetic acid oxidase activity from peas - Science 131, 672 (1960)
- SPIRO, R.G.: Analysis of sugars found in glycoproteins - Methods Enzymol. 8, 3 (1966)
- STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, Springer Verlag, B.H.N.Y. (1967), 2. Auflage

- STOESSL, A. a. M.A. VENIS: Determination of submicrogram levels of indole-3-acetic acid - Anal.Biochem. 34, 344 (1970)
- THIMANN, K.V.: Studies on the growth hormone of plants. VI The distribution of the growth substances in plant tissues - J.Gen.Physiol. 18, 23 (1934)
- TREVELYAN, W.E., D.D. PROCTER a. J.S.H. HARRISON: Detection of sugars on paper chromatograms - Nature 166, 444 (1950)
- UEDA, M. a. R.S. BANDURSKI: A quantitative estimation of alkali-labile indole-3-acetic acid compounds in dormant and germinating Maize kernels - Plant Physiol. 44, 1175 (1969)
- UEDA, M., A. EHMANN a. R.S. BANDURSKI: Gas-liquid chromatographic analysis of indole-3-acetic acid myo-inositol esters in Maize kernels - Plant Physiol. 46, 715 (1970)
- VENIS, M.A.: Auxin-induced conjugation systems in peas - Plant Physiol. 49, 24 (1972)
- WARDI, A.H. a. G.A. MICOS: Alcian-blue staining of glycoproteins in acrylamide disc-electrophoresis - Anal.Biochem. 49, 607 (1972)
- WEBER, H. a. M. OSBORNE: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis - J.Biol.Chem. 244, 4406 (1969)
- WENT, F.W.: Wuchsstoff und Wachstum - Rec.Trav.Bot.Néerl. 25, 1 (1928)
- WHEELER, A.W.: Changes in growth-substance contents during growth of wheat grains - Annal.Appl.Biol. 72, 327 (1972)
- WHISTLER, R.L. a. D.F. DURSO: Chromatographic separation of sugars on charcoal - J.Am.Chem.Soc. 72, 677 (1950)
- WILDMANN, S.G. a. J. BONNER: Observations on the chemical nature and formation of auxin in the avena coleoptile - Am.J.Bot. 35, 740 (1948)
- WILLIAMS, K.W.: Solute-gel interactions in gel-filtration - Lab.Practice 21, 667 (1972)

- WRIGHLEY, C.: Gel electrofocusing - a technique for analyzing multiple protein samples by isoelectric focusing - Sci. Tools 15, 17 (1968)
- ZACCHARIUS, R.M. a. T.E. ZELL: Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels - Anal.Biochem. 30, 148 (1969)
- ZENK, M.H.: 1-(indole-3-acetyl) β -D-glucose, a new compound in the metabolism of indole-3-acetic acid in plants - Nature 191, 493 (1961)
- ZIMMERMANN, H.: Untersuchungen zur Frage der Bindung der IES an Proteine bei Avena und Helianthus - Dissertation der Math.-Nat.Fakultät der Universität Saarbrücken (1971)
- ZIMMERMANN, H.: Untersuchungen zur Extraktion von Indolyl-3-essigsäure-Proteinen aus Hafer - Z.Pflanzenphysiol. 89, 115 (1978)
- ZIMMERMANN, H. u. W. RÜDIGER: Bestimmung des Wuchsstoffes Indolyl-essigsäure (IES) aus Haferkeimlingen auf Dünnschichtplatten - Z.Pflanzenphysiol. 78, 236 (1976)
- ZIMMERMANN, H., C. SIEGERT u. R. KARL: Veränderungen des Wuchsstoffes Indolyl-3-essigsäure bei der Keimung von Avena sativa L. - Z.Pflanzenphysiol. 80, 225 (1976)
- ZWISSLER, O.: Über Proteine aus Hafer - Dissertation TH München (1962)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Rüdiger danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, für seine freundliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. H. Hopf für seine wertvolle Hilfe bei der Bearbeitung aller mit Zuckern in Verbindung stehenden Problemen.

Lebenslauf

- 25.3.1949 geboren in Amberg/Opf. als Tochter des
Röntgenologen Dr. med. Andreas Siegert
und seiner Ehefrau Rosa, geb. Reihls
- 1955 - 1968 Schulzeit:
4 Jahre Volksschule in Amberg, anschließend
Besuch des Neusprachlichen Gymnasiums d. A.
Schulschwestern in Amberg mit Abitur als
Abschluß im Juni 1968
- WS 1968/69 - Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-
SS 1974 Universität in München:
Diplom-Vorprüfung: 1971
Diplom-Hauptprüfung: 1973
Diplomarbeit: September 1973 - Juli 1974
- April 1975 Beginn der Dissertation am Botanischen
Institut der Universität München unter Lei-
tung von Prof. Dr. W. Rüdiger
- November 1975 - Unterbrechung der Promotion aufgrund eines
Mai 1976 Verkehrsunfalls
- Mai 1979 Heirat mit Dipl. Chemiker Dr. Jürgen Benz

